



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Medicina
Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia

ARQUITECTURA AXÓNICA DE LOS CIRCUITOS TALAMO-CORTICALES DEL NÚCLEO GENICULADO LATERAL DORSAL Y EL COMPLEJO LATERAL POSTERIOR/PULVINAR DEL RATÓN

TESIS DOCTORAL

María Ángeles Evangelio Chanzá

Dirigida por los Doctores

Francisco Clascá Cabré y María García-Amado Sancho

Madrid, 2018

ARQUITECTURA AXÓNICA DE LOS CIRCUITOS
TALAMO-CORTICALES DEL NÚCLEO
GENICULADO LATERAL DORSAL Y EL COMPLEJO
LATERAL POSTERIOR/PULVINAR DEL RATÓN

Tesis Doctoral presentada por
MARIA ÁNGELES EVANGELIO CHANZÁ

Directores:
Francisco Clascá Cabré y María García-Amado Sancho

Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid
Madrid, 2018



Facultad de Medicina
Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia

Francisco Clascá Cabré, Catedrático de Anatomía Humana y Neurociencia del Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, y María García-Amado Sancho, Profesora Ayudante Doctor de Anatomía Humana y Neurociencia del Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,

HACEN CONSTAR:

Que Maria Ángeles Evangelio Chanzá ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de Tesis Doctoral “Arquitectura axónica de los circuitos talamo-corticales del núcleo geniculado lateral dorsal y el complejo lateral posterior/pulvinar del ratón”, que ha terminado satisfactoriamente.

Revisado el presente trabajo, quedo conforme con su presentación para ser juzgado.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, lo firmo en Madrid a 8 de enero de 2018.

Fdo.: Francisco Clascá Cabré

Fdo.: María García-Amado Sancho

*We shall not cease from exploration
and the end of all our exploring
will be to arrive where we started
and know the place for the first time.*

T. S. Eliot, Little Gidding

*To my two families,
who always believed in me and had my back.
But specially to Moritz,
for simply being everything I could possibly
ever wish for.*

Resumen

El sistema visual se ha considerado como un modelo clásico de estudio del procesamiento sensorial tradicionalmente en mamíferos, en los que juega un papel clave en su supervivencia, como carnívoros y primates. Sin embargo, recientemente se ha comprobado que las bases del procesamiento visual no están restringidas a estos modelos animales, sino que también se encuentran en el ratón. En los últimos años el ratón se ha posicionado como un importante modelo para el estudio de la estructura y función de circuitos neurales, particularmente de las vías visuales centrales con el fin de entender el funcionamiento de la visión a gran escala.

Las áreas corticales del ratón reciben sus aferencias talámicas principales a través de dos vías paralelas formadoras de imagen originadas en el núcleo geniculado lateral dorsal (dLGN), la principal entrada de información visual desde la retina, y en el complejo lateral posterior (LP), que recibe aferencias esencialmente desde el colículo superior y la corteza cerebral. El complejo LP está formado por tres núcleos distintos: el lateral posterior lateral (LPL), lateral posterior medial rostral (LPMR) y lateral posterior medial caudal (LPMC), cada uno de los cuales exhibe un patrón específico de conexiones con varias áreas corticales visuales y no visuales. En esta tesis doctoral, he realizado un análisis anatómico sistemático de las diferentes arquitecturas axónicas que presentan estas neuronas de proyección localizadas en estos cuatro núcleos que forman el tálamo visual a nivel poblacional y de neurona única. Este análisis proporciona un conjunto de datos a nivel cualitativo y cuantitativo preciso sobre la arquitectura de las proyecciones tálamo-corticales (TC) visuales en el ratón, que todavía no han sido profundamente estudiadas.

En primer lugar, analizamos las posibles diferencias en términos de número y densidad neuronal en el dLGN y el complejo LP. Después, con el fin de estudiar las arquitecturas TC específicas que forman las neuronas localizadas en cada uno de estos núcleos, tomamos tres aproximaciones distintas. Primero, estudiamos a nivel poblacional las aferencias talámicas principales a las áreas visuales primaria y asociativas mediante el trazado retrógrado desde estas áreas corticales. En segundo lugar, marcamos, mediante la aplicación de vectores virales como trazadores anterógrados, micropoblaciones neuronales dentro de cada uno de los cuatro núcleos del tálamo visual, mostrando patrones de distribución tangencial y laminar de sus proyecciones TC específicos en cada núcleo estudiado. Por lo que, posteriormente, analizamos la distribución precisa de sus ramificaciones corticales, así como el tamaño relativo de sus varicosidades en algunas de estas áreas. Finalmente, transfectamos y reconstruimos tridimensionalmente neuronas aisladas localizadas en el dLGN, LPL y LPMR. De esta forma, comprobamos que algunas neuronas localizadas en estos cuatro núcleos talámicos, inervan más

de una región cortical y/o subcortical mediante colaterales axónicas. En algunos casos innervando no sólo áreas visuales, sino también temporales, parietales, e incluso frontales. Con esto observamos que el complejo LP puede actuar no sólo sobre circuitos corticales visuales, sino también sobre muchas otras áreas corticales, así como centros subcorticales como el estriado y la amígdala. Nuestros resultados sugieren que algunos de los núcleos que componen el complejo LP pueden considerarse como un nexo entre múltiples áreas corticales y subcorticales, participando directamente en la ejecución de movimientos guiados visualmente. El presente análisis realizado a nivel poblacional y de célula única recoge de forma completa los principales rasgos de los sistemas de proyección TC del tálamo visual en el ratón.

Abstract

The visual system has always been a classical model to study sensory processing traditionally in highly visual mammals such as carnivores and primates. However, it was recently discovered that many basic forms of visual processing are not restricted to these animal models, but also take place in mice at a fundamental level. Over the past years, the mouse has emerged as an important model to study the structure and function of neural circuits, particularly central visual pathways to enrich our understanding of how vision works on a broad scale.

The mouse visual cortical areas receive their main thalamic inputs through two parallel image forming pathways from the dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN), the major relay to the cortex from the retina, and the lateral posterior (LP) complex, whose main inputs are the superior colliculus and the cortex. The latter consists of three different nuclei: Lateral Posterior Lateral (LPL), Lateral Posterior Medial Rostral (LPMR), and Lateral Posterior Medial Caudal (LPMC), each exhibiting specific patterns of connections with various visual and non-visual cortical areas. In this thesis, we performed a systematic anatomical analysis in mice of the different axonal architectures showed by the long range projecting neurons placed in these four visual thalamic nuclei at a population and single cell level. This analysis provide a comprehensive qualitative and quantitative dataset on visual thalamocortical (TC) wiring architecture in the mouse, which is still little understood.

We first analyzed possible differences in neuron number and density in the dLGN and LP complex. After that, in order to study the particular TC axonal architectures of the neurons located in these nuclei, we performed three different approaches. Firstly, we studied on a population level the sources of thalamic input of mice visual areas through the distribution of

retrogradely-labeled cells following small cortical deposits. Secondly, we labeled the axons arising in small groups of thalamic cells by applying new viral tools as anterograde axonal tracers into the visual thalamus, which showed also nuclei-specific patterns of laminar distribution of axon terminals. Subsequently, we analyzed their TC axon arbor distribution and terminal varicosity size. Finally, we virally transfected *in vivo* individual TC cells and 3D reconstructed their entire dendritic and axonal arbors. This way we proved that some neurons from these four thalamic nuclei can innervate more than one cortical domain by means of axonal collaterals with a different layer pattern, and some of these nuclei target non-visual areas such as temporal, parietal or even frontal cortical areas. We found that the LP complex can strongly influence not only visual cortical circuits, but also multiple other cortical areas, as well as the striatum and amygdala. Our results suggest that some nuclei of the LP complex could be regarded as a hub linking the visual cortex with subcortical regions, participating directly in the execution of visually guided movements. The present micropopulation and single cell analysis provide a comprehensive quantitative dataset on visual TC wiring architecture in the mouse.

Lista de Abreviaturas

A: área visual asociativa anterior	Ent: corteza entorrinal
A1/A2: cortezas auditivas	EPSP: potencial postsináptico excitador
AAV: virus adeno asociado	eYFP: proteína fluorescente amarilla mejorada ("enhanced yellow fluorescence protein")
ABC: Complejo avidina-biotina	FB: fast blue
ac: comisura anterior	FEF: campo ocular frontal
Ac1: anticuerpo primario	FG: fluoro gold
Ac2: anticuerpo secundario	fMRI: resonancia magnética funcional
ACC: corteza cingular anterior	FO: primer orden
AChE: acetil-colin-esterasa	Fr2: corteza frontal, área 2
AGl: corteza agranular lateral (M2)	Fr3: corteza frontal, área 3
AGm: corteza agranular medial (M2)	FrA: corteza frontal sociactiva
Al: corteza insular agranular	GABA: ácido gamma-amino butírico
AID: corteza insular agranular dorsal	GCL: capa de células ganglionares de la retina
AIV: corteza insular agranular ventral	GFP: proteína fluorescente verde
AL: área visual asociativa anterior-lateral	Gl: corteza insular granular
AM: área visual asociativa anterior-medial	GP: globo pálido
Amyg: amígdala	HC: hipocampo
AP: eje antero-posterior	HCl: ácido clorhídrico
APT: área pretectal (PT)	HD: hemisferio derecho
AStr: área de transición estriato-amigdalina	HI: hemisferio izquierdo
Au: corteza auditiva	HO: orden superior
AuD: corteza auditiva dorsal	HRP: peroxidasa de rábano
AuV: corteza auditiva ventral	ic: cápsula interna
AV: núcleo anteroventral del tálamo	IgG: inmunoglobulina G
BD: marcador de RGC α off transitorias	IGL: lámina intergeniculada
BDA: amino-dextrano biotinilado	IL: corteza infralímbica
BLA: núcleo basolateral de la amígdala	ima: lámina medular interna
BSA: albúmina de suero bovino	iNL: capa nuclear interna de la retina
bsc: brazo del colículo superior	IOI: imagen óptica intrínseca
CB: calbindina	iPL: capa plexiforme interna de la retina
Ce: núcleo central de la amígdala	JAMB: marcador de RGC selectivas de dirección off
CE: coeficiente de error	KS: kolmogorov smirnov
Cg: corteza cingular	LA: núcleo lateral de la amígdala
Cg1: corteza cingular primaria	LD: núcleo lateral dorsal
Cg2: corteza cingular secundaria	LDDM: núcleo lateral dorsal, porción dorsomedial
CL: núcleo central lateral del tálamo	LDVL: núcleo lateral dorsal, porción ventrolateral
CM: núcleo centromedial del tálamo	LEnt: corteza entorrinal lateral
CPu: caudado-putamen (CP)	LGN: núcleo geniculado lateral (LGB, LG)
CR: calretinina	LHb: núcleo habenular lateral
CT: córtico-talámico	LI: área visual asociativa lateral intermedia (LL)
CTB: subunidad B de la cólera-toxina	LIPS: sistema proyectante a capa 1
CTB A488: subunidad B de la cólera-toxina asociado a Alexa 488.	LM: área visual asociativa lateral medial
CTB A594: subunidad B de la cólera-toxina asociado a Alexa 594	LO: corteza orbitaria lateral
CyO: citocromo oxidasa	LP: núcleo posterior lateral (LPN/Pul)
DAB: 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorehídrico	LPL: núcleo lateral posterior lateral
DAPI: 4,6'-diamidino-2-fenilindol	LPLC: núcleo lateral posterior lateral, porción caudal
DEPC: dietilpicrocarbonato	LPLr: núcleo lateral posterior lateral, porción rostral
DI: corteza insular disgranular	LPM: porción medial del complejo lateral posterior
DLEnt: corteza entorrinal dorsolateral	LPMC: núcleo lateral posterior medial central (LPcm)
dLGN: núcleo geniculado lateral dorsal (DLG)	LPMR: núcleo lateral posterior medial rostral (LPrm)
DM: núcleo dorsal medial	LPtA: corteza parietal posterior de asociación lateral (PPCI)
DNA: ácido desoxirribonucleico	M1: corteza motora primaria
DSC: estriado central dorsal	M2: corteza motora secundaria
DSGC: células ganglionares selectivas de dirección	MEnt: corteza entorrinal medial
DV: eje dorso-ventral	mGluR: receptor metabotrópico de glutamato
Ect: corteza entorrinal	MGN: núcleo geniculado medial

MGd: núcleo geniculado medial dorsal
 MGv: núcleo geniculado medial ventral
 ML: eje medio-lateral
 MM: área visual asociativa medial
 MO: corteza orbitaria medial
 MPtA: corteza parietal posterior de asociación medial (PPCm)
 M-W: Mann-Whitney
 n: tamaño muestral
 N: número total de neuronas
 NaCl: cloruro sódico
 NGS: suero normal de cabra
 oNL: capa nuclear externa de la retina
 oPL: capa plexiforme externa de la retina
 opt: tracto óptico (OT, ot)
 P: área visual asociativa posterior
 Pas: parasubículo
 PB: núcleo parabraquial (PBN)
 PB: tampón fosfato
 PBN: núcleo parabraquial
 PBS: tampón fosfato salino
 Pc: núcleo paracentral
 PET: tomografía de emisión de positrones
 Pf: núcleo talámico parafascicular
 PFA: paraformaldehído
 PHA-L: leucoaglutinina de *Phaseolus vulgaris*
 PM: área visual asociativa postero-medial
 Po: núcleo posterior del tálamo
 POC: núcleo posterior del tálamo, porción caudal
 POm: núcleo posterior del tálamo, porción medial
 POR: área visual asociativa postrinal
 PoS: postsubículo
 Post: corteza cerebral posterior
 PPt: corteza parietal posterior (PPC, PPT)
 PPT: núcleo pedúnculo pontino
 PtPD: corteza parietal posterior dorsal (RL)
 PtPR: corteza parietal posterior rostral
 PRh: corteza perirrinal (PR)
 PrL: corteza prelímbica
 PrS: presubículo
 Pu: putamen
 Pul: complejo pulvinar (P)
 Re: núcleo reuniens
 RF: campo receptivo
 RL: área visual asociativa rostrolateral
 RGC: célula ganglionar retiniana
 RNA: ácido ribonucleico
 RS: corteza retrosplenial

RSD: corteza disgranular retrosplenial (RSA)
 RSG: corteza granular retrosplenial
 Rt: núcleo reticular talámico
 S1: corteza somatosensorial primaria
 S2: corteza somatosensorial secundaria
 SC: colículo superior
 SD: desviación estándar
 SEM: error estándar de la media
 SGS: estrato gris superficial del colículo superior
 SGI: estrato gris intermedio del colículo superior
 SNr: sustancia negra, porción reticulada
 SO: estrato óptico del colículo superior
 Str: estriado
 Th: tálamo (Thal)
 TAS: tampón acetato sódico
 TC: tálamo-cortical
 TE1: área temporal 1
 TE2: área temporal 2
 TE3: área temporal 3
 TeA: área temporal anterior
 TMR: tetrametilrodamina
 TRHR: receptor de la hormona liberadora de tirotropina
 TRN: núcleo reticular del tálamo (Rt)
 UV: ultravioleta
 V: volumen nuclear
 V1: corteza visual primaria /estriada
 V2L: corteza visual secundaria lateral (Oc2L)
 V2Loc: área visual asociativa lateral occipital
 V2ML: corteza visual secundaria mediolateral (Oc2M, Vm)
 V2MM: corteza visual secundaria mediomedial
 V2MMoc: área visual asociativa medial occipital
 VA: núcleo ventral anterior del tálamo
 vGLUT2: transportador vesicular de glutamato de tipo 2
 VL: núcleo talámico ventral lateral
 vLGN: núcleo geniculado lateral ventral
 VLO: corteza orbitaria ventral lateral
 VM: núcleo ventromedial
 VO: corteza orbitaria ventral
 VP: núcleo ventral posterior
 VPL: núcleo ventral posterior lateral (VPI)
 VPM: núcleo ventral posterior medial
 WGA: germen de aglutinina de trigo
 WM: sustancia blanca (SB)
 ZI: zona incerta

*Las abreviaturas se han tomado en su forma del inglés para facilitar la introducción y comparación de figuras procedentes artículos científicos que incluyen las abreviaturas anglosajonas. Además, las figuras del apartado de resultados se han preparado para su inmediata publicación en una revista internacional por lo que requiere de esta nomenclatura. Entre paréntesis aparecen otras abreviaturas utilizadas por diferentes autores para referirse a una misma región encefálica.

Lista de Figuras

Figura 1.	Ontogenia de los núcleos talámicos.	6
Figura 2.	Distribución laminar de los axones TC específicos e inespecíficos en la corteza cerebral de ratones postnatales.	7
Figura 3.	Esquema de los patrones de proyección TC en el gato en función del grado de especificidad o dispersión en corteza.	10
Figura 4.	Tipos y distribución de neuronas tálamo-corticales en primate.	11
Figura 5.	Resumen de las características anatómicas y electrofisiológicas de las aferencias driver o de tipo 1, y modulador o de tipo 2.	13
Figura 6.	Esquema de las vías de comunicación córtico-cortical directa y transtalámica.	15
Figura 7.	Representación esquemática de los morfotipos generales identificados de neuronas de proyección TC.	20
Figura 8.	Esquema mostrando las posiciones en el árbol evolutivo de los mamíferos placentarios.	23
Figura 9.	Esquema resumen de las dos vías principales encargadas de llevar la información visual desde la retina a las áreas visuales estriada y extraestriadas.	24
Figura 10.	Esquema resumen de las principales estructuras encefálicas implicadas en las vías directa e indirecta del procesamiento de la información visual.	25
Figura 11.	Resumen de la organización básica y arquitectura laminar donde aparecen representados los siete tipos celulares principales que conforman la retina del ratón.	26
Figura 12.	Tipos de RGC caracterizados en base a su patrón de terminación y función en el dLGN de ratón.	27
Figura 13.	Esquema de la segregación de las proyecciones ipsilaterales y contralaterales procedentes de la retina en cada una de las estaciones de relevo de la vía directa o geniculada.	28
Figura 14.	Mapa de la distribución retinotópica de los terminales retinofugales en el SC mediante imagen óptica intrínseca.	29
Figura 15.	Distribución de los terminales axónicos retinofugales del colículo superior del ratón.	30
Figura 16.	Representación de las áreas visuales en el ratón en una vista dorsal subdivididas en base a su patrón de conexiones callosas interhemisféricas.	31
Figura 17.	Hemisferios izquierdos del ratón donde se muestran dos modelos propuestos de la organización de sus áreas visuales estriadas y extraestriadas.	31
Figura 18.	Representaciones de la vista dorsal de V1 en las que se han dibujado las líneas correspondientes a los grados de elevación y azimuth determinadas mediante registro electrofisiológico.	32
Figura 19.	Tres modelos de representación de la retinotopía en una vista dorsal de las áreas visuales estriada y extraestriadas del hemisferio izquierdo del ratón.	33

Figura 20.	Delimitación de las áreas visuales extraestriadas en el ratón en base a su conectividad.....	34
Figura 21.	Representación esquemática de las áreas visuales primaria y asociativas sobre mapas planos de la visión dorsal del hemisferio izquierdo.	35
Figura 22.	Mapa cortical retinotópico que muestra los contornos de las cortezas visuales primaria y asociativas sobre los que se representan las líneas de azimuth y elevación.....	37
Figura 23.	Vía directa de transmisión de la información visual	38
Figura 24.	Morfología de las neuronas del dLGN marcadas mediante el método de Golgi en un ratón de cinco días.....	40
Figura 25.	Distribución de las neuronas GABAérgicas en el dLGN y el complejo LP de roedores.....	41
Figura 26.	Organización espacial retinotópica de las neuronas TC dentro del dLGN	42
Figura 27.	Ejemplos de tipos funcionales de neuronas TC en el dLGN	43
Figura 28.	Esquema resumen de las aferencias y eferencias al dLGN segregadas funcionalmente a lo largo de todo el circuito de la vía geniculada	44
Figura 29.	Delimitación de los mapas monocular y binocular en el dLGN.	45
Figura 30.	Resumen de las características anatómicas y electrofisiológicas de las aferencias driver o de tipo 1, y modulador o de tipo 2.	46
Figura 31.	Distribución de las aferencias tecto-talámicas al dLGN en un ratón TRHR transgénico que expresa GFP en sus células DSGC.	47
Figura 32.	Representación de la topografía y disposición laminar de las proyecciones geniculo-corticales.....	48
Figura 33.	Ontogenia de las neuronas del complejo LP.	51
Figura 34.	Organización retinotópica de las neuronas del complejo LP en ratones.	52
Figura 35.	Sección parasagital del encéfalo de rata donde se muestran las regiones que presentan inmunoreactividad frente a calretinina.....	53
Figura 36.	Distribución de los terminales procedentes del SC que llegan de forma ipsilateral al LPL y bilateral al LPMC sobre secciones coronales del complejo LP del ratón. ..	54
Figura 37.	Esquemas de la organización nuclear del complejo LP en el ratón y la ardill.	55
Figura 38.	Marcado retrógrado de las proyecciones del SC al dLGN y al complejo LP de roedor.	56
Figura 39.	Distribución topográfica de las conexiones del SC con el complejo LP marcadas mediante trazadores retrógrados.	57
Figura 40.	Distribución de terminales tecto-talámicos marcados tras un depósito de BDA en las capas superficiales del SC.	57
Figura 41.	Marcado de las conexiones tecto-talámicas desde las capas superficiales del SC marcadas mediante vectores virales.	58
Figura 42.	Densidad y distribución de los tres principales orígenes de proyecciones aferentes al complejo LP.....	59

Figura 43.	Esquema resumen de algunas de las principales aferencias al complejo LP, desde las capas superficiales del SC y desde cortezas visuales primaria, asociativa y temporales.....	61
Figura 44.	Reconstrucciones bajo cámara clara de las proyecciones diencefálicas de neuronas corticales de capa 5 y 6.....	62
Figura 45.	Marcado retrógrado de las proyecciones del complejo LP a las áreas extraestriadas LM, LI y AL.....	64
Figura 46.	Organización de las conexiones marcadas retrógradamente entre el complejo LP y cinco áreas visuales consideradas (V1, LM, AL, AM, RL).	65
Figura 47.	Esquemas que ilustran las conexiones de los dos núcleos del complejo LP receptores de aferencias del SC (LPL y LPMC).....	66
Figura 48.	Distribución de las proyecciones TC del núcleo LPMC tras su marcado anterógrado poblacional.	67
Figura 49.	Esquemas coronales talámicos de rata en los que se muestra la distribución de neuronas retrógradamente marcadas tras un depósito en TeA-Ect-PRh y un depósito en LA.	68
Figura 50.	Marcado retrógrado de las conexiones entre cortezas motora y parietal posterior con los núcleos del complejo LP.	69
Figura 51.	Distribución de las neuronas del complejo LP retrógradamente marcadas que proyectan a las áreas motora y cingular anterior.....	70
Figura 52.	Localización de las neuronas retrógradamente marcadas del complejo LP que proyectan áreas visuales extraestriadas y retroespleniales.....	72
Figura 53.	Representación esquemática sobre una sección coronal del encéfalo de rata de la topografía de los campos terminales cortico-estriales en el estriado dorso-central.....	74
Figura 54.	Marcado de la conectividad del circuito formado por SC, LPMC y LA.....	75
Figura 55.	Conectividad entre el LPMC, cortezas temporales, el estriado y la amígdala.....	76
Figura 56.	Fotografía del cráneo del ratón donde se muestra marcado en negro la posición del seno transversal.....	88
Figura 57.	Instantánea realizada durante el procedimiento quirúrgico para la aplicación de un trazador anterógrado.	89
Figura 58.	Experimentos de trazado utilizando el vector viral AAV-GFP.....	97
Figura 59.	Microfotografías de secciones sagitales talámicas mostrando los distintos tamaños de micropoblaciones marcadas durante la puesta a punto del método de marcado axónico mediante el vector AAV-GFP.....	98
Figura 60.	Evolución de la inmunorreactividad frente al palGFP tras la inyección del vector viral Sindbis en el núcleo talámico ventrobasal de la rata.	100
Figura 61.	Esquema del método de aplicación en un núcleo talámico de la monohebra de RNA procedente del vector viral Sindbis-pal-eGFP mediante electroporación in vivo.	102

Figura 62.	Generación de un atlas estereotáxico del polo temporal del encéfalo del ratón tomando basándonos inicialmente en varias tinciones histoquímicas e inmunohistoquímicas.	114
Figura 63.	Esquemas obtenidos a partir de la delimitación de áreas mediante las distintas tinciones histoquímicas utilizadas junto a la corrección de estos límites realizada con la ayuda del atlas tridimensional.	115
Figura 64.	Desarrollo de la composición del mapa plano de la superficie cortical del hemisferio derecho del ratón, según la orientación que se muestra en la figura.	117
Figura 65.	Mapa plano de la superficie cortical de las áreas visuales estriada y extraestriada.	118
Figura 66.	Microfotografías de dos secciones histológicas coronales del tálamo de ratón donde se representa el contorno del dLGN y el LP.	123
Figura 67.	Microfotografía de una sección histológica coronal talámica donde aparece un ejemplo de somas de dLGN.	125
Figura 68.	Microfotografías de dos secciones histológicas coronales donde aparece un ejemplo de axones y varicosidades axónicas en LM procedentes de una neurona aislada situada en LPL.	126
Figura 69.	Representación en 3D del núcleo dLGN y el complejo LP	144
Figura 70.	Delimitación de las subdivisiones del complejo LP.	147
Figura 71.	Proyecciones de las capas superficiales del SC (estrato gris superficial y estrato óptico) al complejo LP caudal.	148
Figura 72.	Resumen de los casos utilizados para el estudio de la organización topográfica del dLGN mediante experimentos de trazado retrógrado.	150
Figura 73.	Distribución del porcentaje de somas retrógradamente marcados a lo largo del eje medio-lateral.	152
Figura 74.	Representación esquemática de los somas marcados retrógradamente contenidos en un volumen tridimensional para su visualización de su patrón de distribución en el plano coronal.	152
Figura 75.	Resumen de los casos utilizados para el estudio de la organización topográfica del dLGN mediante experimentos de trazado retrógrado.	154
Figura 76.	Resumen de los casos utilizados para el estudio de la organización topográfica del dLGN mediante experimentos de trazado retrógrado.	156
Figura 77.	Resumen de los depósitos de trazadores anterógrados, BDA y AAV-GFP, en dLGN analizados en este trabajo.	158
Figura 78.	Distribución de las proyecciones TC de 6 depósitos representativos de BDA y AAV-GFP limitados al dLGN.	160
Figura 79.	Distribución de los terminales axónicos TC radialmente en las distintas láminas corticales procedentes de los depósitos anterógrados localizados en el núcleo dLGN.	161
Figura 80.	Colección de los depósitos de trazadores anterógrados (BDA y AAV-GFP) en LPL que incluye este trabajo, mostrados en secciones sagitales de ratón.	163

Figura 81.	Representación de la distribución de las proyecciones TC de 3 depósitos representativos de trazadores anterógrados limitados al LPL.	165
Figura 82.	Representación esquemática del patrón laminar general en las áreas de máxima proyección de los depósitos de trazador anterógrado en LPL.	166
Figura 83.	Distribución de la innervación estriatal en dos depósitos de trazadores anterógrados localizados en LPL.....	167
Figura 84.	Resumen de los depósitos de trazadores anterógrados, BDA y AAV-GFP, en LPMC recogidos en este trabajo mostrados en secciones sagitales de ratón.	168
Figura 85.	Distribución de los árboles axónicos corticales de dos depósitos representativos de BDA y AAV-GFP localizados mayoritariamente en LPMC en regiones laterales o mediales del mismo.	169
Figura 86.	Representación esquemática del patrón laminar general en las áreas de máxima proyección de los depósitos de trazador anterógrado en el núcleo LPMC.	170
Figura 87.	Distribución de la innervación estriatal y amigdalina en cuatro depósitos localizados en LPMC.....	171
Figura 88.	Resumen de los depósitos de los dos trazadores anterógrados utilizados en LPMR analizados en este trabajo mostrados en secciones sagitales de ratón.	173
Figura 89.	Representación de la distribución tangencial de las proyecciones TC de 5 depósitos representativos de trazadores anterógrados cuya extensión se adscribe principalmente al núcleo LPMR.	176
Figura 90.	Distribución de los terminales axónicos TC radialmente en las distintas láminas corticales, como queda indicado en la leyenda, procedentes de los depósitos anterógrados localizados en el núcleo LPMR.	177
Figura 91.	Distribución de la innervación estriatal y amigdalina en cuatro depósitos de trazadores anterógrados localizados en LPMR.	178
Figura 92.	Comparación del tamaño de las varicosidades axónicas procedentes de los núcleos dLGN y LPMR.	181
Figura 93.	Distribución subcortical y cortical de los axones de dos neuronas aisladas transfectadas en un mismo experimento con el RNA del vector Sinbis-GFP en el núcleo dLGN.....	184
Figura 94.	Distribución subcortical y cortical de los axones de dos neuronas aisladas transfectadas con el RNA del vector Sinbis-GFP y con el DNA plasmídico del vector AAV-GFP localizadas en distintas regiones del núcleo LPL.	185
Figura 95.	Distribución subcortical y cortical de los axones de dos neuronas aisladas transfectadas con viriones del vector Sinbis-GFP localizadas en distintas regiones del núcleo LPL.	186
Figura 96.	Distribución subcortical y cortical de los axones de dos neuronas aisladas transfectadas con viriones del vector AAV localizadas en regiones anterior y posterior del núcleo LPMR.	187
Figura 97.	Resumen de los patrones comunes de distribución tangencial de las proyecciones TC originadas en los núcleos talámicos visuales.....	211

Anexo 1.	Resumen de los casos analizados para el estudio mediante marcado anterógrado de las proyecciones del dLGN.	257
Anexo 2.	Resumen de todos los casos considerados para el estudio mediante marcado anterógrado de las proyecciones del núcleo LPL.	258
Anexo 3.	Resumen de los todos casos considerados para el estudio mediante marcado anterógrado de las proyecciones del núcleo LPMC.....	259
Anexo 4.	Resumen de los casos considerados para el estudio mediante marcado anterógrado de las proyecciones del núcleo LPMR.....	260

Lista de Tablas

Tabla 1.	Coordenadas estereotáxicas empleadas para realización de los depósitos columnares de trazadores retrógrados en las cortezas visuales estriada y extraestriada.....	91
Tabla 2.	Coordenadas estereotáxicas empleadas para realización de los depósitos columnares de trazadores retrógrados en las áreas corticales limitantes con las cortezas visuales en el ratón.	92
Tabla 3.	Coordenadas estereotáxicas empleadas para realización de los depósitos bilaterales de trazadores anterógrados en los núcleos del tálamo visual.	94
Tabla 4.	Protocolos experimentales usados para el marcado de micropoblaciones de neuronas con pseudoviriones de AAV mediante microiontoforesis.	97
Tabla 5.	Anticuerpos empleados en las técnicas inmunohistoquímicas y de inmunofluorescencia para la detección de las distintas proteínas y trazadores neuronales.	113
Tabla 6.	Parámetros estereológicos empleados en las estimaciones de número de neuronas y número de varicosidades.....	127
Tabla 7.	Resumen del total de casos inyectados con trazadores retrógrados en distintas áreas corticales.	128
Tabla 8.	Resumen del total de casos inyectados con trazadores anterógrados (BDA y vector AAV-GFP) en los distintos núcleos del tálamo visual de roedores.	132
Tabla 9.	Resumen del total de casos de neurona aislada inyectados con trazadores anterógrados (BDA y vector AAV-GFP) en los núcleos dLGN, LPL, LPMC y LPMR de roedores.....	137
Tabla 10.	Estimación del número de neuronas (N) y del volumen nuclear (V) de dLGN en cada uno de los 10 hemisferios analizados.	144
Tabla 11.	Estimación del número de N y del V del complejo LP en cada uno de los 5 animales analizados.	144
Tabla 12.	Resumen de la distribución tangencial de los axones TC marcados con los depósitos de BDA y AAV-GFP en dLGN que hemos analizado en este trabajo. ...	162
Tabla 13.	Representación cualitativa de la distribución tangencial de los axones TC marcados de cada uno de los depósitos anterógrados analizados del núcleo LPL.	167
Tabla 14.	Resumen mostrando la densidad de marcado axónico terminal de forma cualitativa en la corteza cerebral.....	172
Tabla 15.	Resumen de la distribución cortical de terminales axónicos marcados tras depósitos de trazadores anterógrados en el núcleo LPMR.	179
Tabla 16.	Resumen de los parámetros morfológicos del dominio somatodendrítico y de los campos terminales axónicos considerados en este estudio para las cuatro primeras neuronas aisladas descritas anteriormente.	188

INDICE

Resumen	IX
Abstract	X
Lista de Abreviaturas.....	XIII
Lista de Figuras	XV
Lista de Tablas	XXI
I INTRODUCCIÓN	2
1 GENERALIDADES DEL TÁLAMO Y DE LAS PROYECCIONES TÁLAMO-CORTICALES	4
2 DESARROLLO METODOLÓGICO PARA EL ESTUDIO DE LAS PROYECCIONES TÁLAMO-CORTICALES	6
3 ESTUDIOS DE LA ARQUITECTURA DE LAS PROYECCIONES TÁLAMO-CORTICALES EN NEURONAS INDIVIDUALES	15
4 SISTEMA VISUAL DE ROEDORES	21
4.1 Componentes de las vías de procesamiento visual	23
4.2 Retina	25
4.3 Colículo Superior	28
4.4 Divisiones y organización de las áreas visuales en ratón	30
4.5 Características de la corteza visual primaria	36
5 NÚCLEO TALÁMICO GENICULADO LATERAL DORSAL (dLGN)	39
5.1.1 Aferencias	45
5.1.1.1 Subcorticales	45
5.1.1.1.1 Retina	45
5.1.1.1.2 Colículo Superior	46
5.1.1.1.3 Otras estructuras subcorticales	47
5.1.1.2 Corticales	47
5.1.1.2.1 Corteza Visual	47
5.1.2 Eferencias	48
5.1.2.1.1 Corteza visual primaria	48
5.1.2.1.2 Cortezas visuales asociativas	48
6 COMPLEJO NUCLEAR LATERAL-POSTERIOR DEL TÁLAMO	49
6.1.1 Divisiones del complejo LP	52
6.1.2 Aferencias	55
6.1.2.1 Subcorticales	55
6.1.2.1.1 Colículo superior	55
6.1.2.1.2 Retina	59
6.1.2.1.3 Otros núcleos del tronco del encéfalo	59

	6.1.2.2	Corticales.....	60
	6.1.2.2.1	Corteza visual	60
	6.1.3	Eferencias	62
	6.1.3.1	Corticales.....	62
	6.1.3.1.1	Corteza estriada	62
	6.1.3.1.2	Cortezas extraestriadas.....	63
	6.1.3.1.3	Cortezas temporales y parahipocampales	66
	6.1.3.1.4	Cortezas parietales, cingulares y motoras	68
	6.1.3.1.5	Cortezas retroespleniales.....	71
	6.1.3.1.6	Cortezas frontal asociativa y prelímbica	72
	6.1.3.1.7	Cortezas orbitales.....	72
	6.1.3.1.8	Corteza insular	73
	6.1.3.2	Subcorticales	73
	6.1.3.2.1	Estriado dorsal.....	73
	6.1.3.2.2	Amígdala.....	74
	6.1.4	Estudios de neurona única	76
	6.1.5	Organización funcional del complejo LP	77
II		PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS	80
III		MATERIALES Y MÉTODOS	84
1		ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	86
1.1		Anestesia y cirugía.....	87
2		EXPERIMENTOS DE TRAZADO POBLACIONAL.....	89
2.1		Experimentos de trazado retrógrado	89
2.2		Experimentos de trazado anterógrado	93
2.2.1		Realización de microdepósitos de BDA	93
2.2.2		Realización de microdepósitos mediante la inyección de pseudoviriones de vectores virales.	94
3		EXPERIMENTOS DE TRAZADO DE NEURONA ÚNICA	98
3.1		Marcado de neuronas aisladas mediante la inyección de pseudoviriones SindBis	99
3.2		Marcado de neuronas aisladas mediante electroporación <i>in vivo</i> de RNA del vector viral SindBis.....	100
3.3		Marcado de neuronas aisladas mediante electroporación <i>in vivo</i> de DNA del vector viral AAV	103
4		SACRIFICIO Y PERFUSIÓN	104
5		PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO	104
5.1		Corte seriado del tejido	104
5.2		Experimentos de trazado retrógrado	105

5.2.1	Tinción histoquímica para detectar la actividad de la enzima citocromo oxidasa (CyO)	105
5.2.2	Inmunofluorescencia de CTB libre	106
5.3	Experimentos de trazado anterógrado poblacional y célula única	107
5.3.1	Revelado de BDA	107
5.3.2	Inmunohistoquímica contra eGFP	108
5.3.3	Doble inmunomarcado de eGFP y el transportador vesicular de glutamato tipo 2 (VGluT2)	109
5.4	Tinciones para la delimitación de núcleos talámicos y áreas corticales de interés	110
5.4.1	Tinciones de Nissl y Gallyas	110
5.4.2	Inmunohistoquímica frente a calretinina (CR), calbindina (CB) y VGluT2.....	111
6	MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	113
6.1	Generación de un atlas de las secciones sagitales más laterales del encéfalo de ratón	113
6.2	Generación de un mapa plano de la superficie cortical	116
6.3	Análisis de los experimentos de trazado retrógrado	118
6.3.1	Microscopía de epifluorescencia.....	118
6.4	Análisis de los experimentos de trazado anterógrado.....	119
6.4.1	Microscopía confocal	121
6.5	Análisis de los experimentos de trazado de neurona única.....	122
6.6	Estimaciones estereológicas	122
6.6.1	Estimación del volumen nuclear (V_{nuc}) mediante el principio de Cavalieri	123
6.6.2	Estimación del número de neuronas (N_{neu}) usando el fraccionador óptico	124
6.6.3	Estimación del número de varicosidades (N_{var}) y longitud absoluta en las neuronas únicas (L_{ax})	125
IV	RESULTADOS.....	140
1	CARACTERIZACIÓN ANATÓMICA DE LOS NÚCLEOS dLGN Y EL COMPLEJO LP	143
1.1	Descripción anatómica y análisis cuantitativo del dLGN y LP	143
1.2	Delimitación de las subdivisiones del LP	145
2	ESTUDIO MEDIANTE TRAZADO RETRÓGRADO DE LA LOCALIZACIÓN DENTRO DEL dLGN Y EL COMPLEJO LP DE LAS NEURONAS QUE INERVAN LAS ÁREAS VISUALES	149
2.1	Depósitos en corteza estriada	149
2.2	Depósitos en cortezas extraestriadas laterales.....	153
2.3	Depósitos en cortezas extraestriadas dorsales y mediales.....	155

3	MAPEO SISTEMÁTICO MEDIANTE TRAZADO ANTERÓGRADO POBLACIONAL DE LAS PROYECCIONES CORTICALES Y SUBCORTICALES DE LAS NEURONAS DEL dLGN Y DEL LP	157
3.1	Análisis de la distribución cortical de las neuronas de proyección del dLGN	157
3.2	Análisis de la distribución subcortical y cortical de las neuronas de proyección del LPL.....	162
3.3	Análisis de la distribución subcortical y cortical de las neuronas de proyección del LPMC.....	168
3.4	Análisis de la distribución subcortical y cortical de las neuronas de proyección del LPMR.....	172
3.5	Análisis de tamaño de las varicosidades axónicas de los distintos núcleos del tálamo visual.....	179
4	ESTUDIO CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE NEURONAS AISLADAS EN EL TÁLAMO VISUAL.....	182
4.1	Arquitectura de las neuronas del dLGN	183
4.2	Arquitectura de las neuronas del complejo LP	184
V	DISCUSIÓN	190
1	CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS	193
1.1	Modelo animal y área del estudio.....	193
1.2	Marcado y análisis retrógrado y anterógrado de proyecciones axónicas a nivel poblacional	195
1.3	Marcado y análisis de neuronas únicas.....	197
2	ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL dLGN Y EL COMPLEJO LP	198
3	SISTEMA DE PROYECCIÓN DEL NÚCLEO dLGN	199
4	SISTEMA DE PROYECCIÓN DEL NÚCLEO LPL.....	201
4.1	Dianas corticales.....	201
4.2	Dianas subcorticales.....	203
5	SISTEMA DE PROYECCIÓN DEL NÚCLEO LPMC.....	204
5.1	Dianas corticales.....	204
5.2	Dianas subcorticales.....	206
6	SISTEMA DE PROYECCIÓN DEL NÚCLEO LPMR.....	207
6.1	Dianas corticales.....	207
6.2	Dianas subcorticales.....	209
7	ANÁLISIS DEL TAMAÑO DE LAS VARICOSIDADES AXÓNICAS CORTICALES DE LAS PROYECCIONES DE LOS DISTINTOS NÚCLEOS DEL TÁLAMO VISUAL.....	211
VI	CONCLUSIONES.....	214
VII	BIBLIOGRAFÍA	218
ANEXOS	254

I INTRODUCCIÓN

1 GENERALIDADES DEL TÁLAMO Y DE LAS PROYECCIONES TÁLAMO-CORTICALES.

Los primeros estudios descriptivos del siglo XIV sobre la estructura anatómica denominada *thalamos* o cámara por Galeno, lo definen como dos masas heterogéneas de sustancia gris con forma ovoide situadas en la parte dorsal del diencefalo adheridas en la línea media (Scholpp y Lumsden 2010; Saalman y Kastner 2011). Inicialmente, el tálamo fue considerado únicamente como una estructura anatómica receptora del tracto óptico, por lo que se le conocía como tálamo óptico (Willis 1964). Sin embargo, en el siglo XVIII, se le comenzó a asociar con una estructura puramente encargada de filtrar y transmitir la información sensorial, en base a sus aferencias y eferencias, especialmente visuales (Luys 1865).

El complejo talámico está localizado en la parte posterior del diencefalo, caudal al foramen intraventricular, e incluye el pretálamo y el tálamo, también denominados tálamo ventral y dorsal respectivamente (Scholpp y Lumsden 2010). Desde el punto de vista anatómico, como observó Burdach (1982) tras disecar la cápsula interna, se identifica en la cara lateral de este complejo nuclear una fina banda de fibras mielinizadas, denominada lámina medular externa que separa el tálamo de estructuras pretalámicas como el núcleo reticular talámico (TRN); y en su interior otra lámina de características morfológicas similares, denominada lámina medular interna (ima), que divide el tálamo en los grupos nucleares ventrales, laterales, el núcleo dorsomediano (DM) y los núcleos de la línea media. Rostralmente, se bifurca para rodear al grupo nuclear anterior. Además, esta lámina medular interna va a albergar los núcleos talámicos intralaminares. El grupo ventral incluye los núcleos talámicos ventral posterior (VP), ventral anterior (VA), ventral lateral (VL) y ventral medial (VM), y el grupo lateral está compuesto por los núcleos lateral dorsal (LD) y el complejo lateral posterior (LP). En el polo caudal del tálamo encontramos el grupo nuclear posterior y dos pequeñas protrusiones denominadas cuerpos geniculados lateral (LGN) y medial (MGN) (Nieuwenhuys et al. 1998). En la actualidad, el tálamo dorsal se considera una estructura con un importante papel como nodo comunicativo intercalado entre numerosas estructuras del sistema nervioso. La función de cada uno de estos núcleos que lo conforman viene dada por el tipo de aferencias (tanto subcorticales como corticales) y de eferencias que manda a estructuras subcorticales telencefálicas (como el estriado (Str, Royce 1983; Macchi et al. 1984; Groenewegen y Berendse 1994; Galvan y Smith 2011), la amígdala (Amyg, Doron y Ledoux 1999; Day-Brown et al. 2010a), el claustró (Carey y Neal 1985)) y, de forma recíproca, a una o varias regiones corticales. Estas extensas proyecciones tálamo-corticales (TC) excitatorias glutamatérgicas recíprocas pueden alcanzar áreas de

neocorteza, paleocorteza y arquicorteza, permitiendo vehicular la información sensitiva (excepto la sensibilidad olfativa) y motora (desde los ganglios basales y el cerebelo) por canales independientes (Jones 2007). Las aferencias glutamatérgicas excitatorias del tálamo (tanto corticales como subcorticales) han sido estudiadas ampliamente, y con frecuencia no se ha tenido en cuenta o se ha subestimado la existencia de una importante entrada inhibitoria. Estas aferencias GABAérgicas tiene su origen en núcleos pertenecientes al tálamo ventral como la zona incerta (ZI) y el TRN. Estas conexiones son la principal fuente de inhibición en el tálamo en el caso de los roedores, ya que su porcentaje de interneuronas intrínsecas es muy bajo localizándose casi de manera exclusiva en el LGN y el complejo LP (Ottersen y Storm-Mathisen 1984; Bentivoglio et al. 1991; Arcelli et al. 1996; Li et al. 2003; Seecharan et al. 2003; Shi et al. 2017). Además, la proyección desde el TRN es recíproca y topográficamente organizada, ya que todas las neuronas de proyección TC excitatorias van a contactar ipsilateralmente con este núcleo (Velayos et al. 1989; Pinault 2004).

Por tanto, en conjunto, el tálamo posee una función de nodo, actuando como relevo, así como integrando y modulando a la vez señales sensitivas y motoras en su camino a la corteza cerebral gracias a una vía paralela de reentrada de la información córtico-tálamo-cortical que permite esta modulación (Theyel et al. 2010); a la vez que va a realizar funciones cognitivas de orden superior, al tener un importante papel en mecanismos atencionales, en la regulación de los estados de sueño y vigilia e incluso, en muchos casos, se le ha denominado al tálamo, de forma filosófica, como puerta de entrada a la consciencia (Scholpp y Lumsden 2010). A pesar de la gran importancia funcional del tálamo, a día de hoy no han sido estudiadas en profundidad de forma sistemática las múltiples arquitecturas de sus neuronas de proyección TC que le permiten llevar a cabo dichas funciones.

De igual forma, los mecanismos subyacentes al desarrollo y organización de estos núcleos talámicos apenas se han estudiado con detalle. El tálamo está formado por más de 30 núcleos citoarquitectónica- y funcionalmente distintos, y con un patrón de proyecciones eferentes específico (Oh et al. 2014; Shi et al. 2017). Gracias al estudio de la distribución de la expresión génica de varios factores de transcripción, que por analogía a lo largo de la filogenia, dirigen programas de histogénesis y morfogénesis subyacentes a la organización definitiva del encéfalo definitiva (Shimamura et al. 1997; Lein et al. 2007; Nakagawa y Shimogori 2012), se han determinado el origen y desarrollo de los núcleos talámicos. El tálamo deriva del neuroepitelio de la región alar caudal del prosómero dos (P2) (Puelles y Rubenstein 2003; Vue et al. 2007), donde decisiones tempranas del destino celular son controladas por el centro de señalización local diencefálico medial que juega un papel director en la regionalización de los distintos

núcleos talámicos (Scholpp y Lumsden 2010). Por ello, de la región rostral de este dominio progenitor de P2 van a desarrollarse las neuronas inhibitorias localizadas en el pretálamo y en muy bajo número en el tálamo (Shi et al. 2017). Estudios recientes sobre el desarrollo ontogenético de la configuración y organización nuclear dentro del tálamo de roedores demuestran la existencia de tres grupos de progenitores que van a dar lugar a neuronas localizadas en distintos grupos de núcleos talámicos mencionados anteriormente (Figura 1). Estas tres agrupaciones de progenitores se han denominado “md”, que da lugar a los núcleos posterior (Po), centromedial (CM), MD y LP; un grupo de progenitores “mvp” que forma los núcleos reuniens (Re) en su porción caudal, VP, VA, LGN, MGN y la porción caudal del VM; y finalmente el linaje de grupo “a”, que engloba los núcleos talámicos del grupo anterior, LD y porción anterior del VM y Re (Shi et al. 2017).

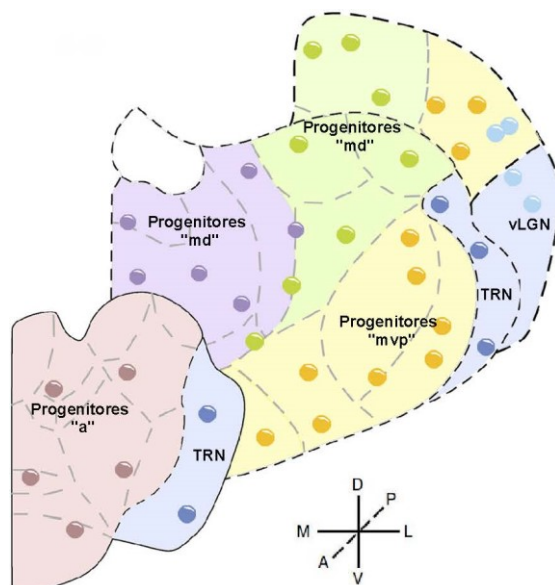


Figura 1. Ontogenia de los núcleos talámicos. Esquemas del origen ontogenético y distribución espacial de los grupos de progenitores que formarán los núcleos talámicos en mamíferos. Ver lista de abreviaturas. Modificado de Shi et al. (2017).

2 DESARROLLO METODOLÓGICO PARA EL ESTUDIO DE LAS PROYECCIONES TÁLAMO-CORTICALES

A través de los trabajos pioneros de Ramón y Cajal (1900) en relación a las bases de la organización anatómica del encéfalo de mamíferos, se pudo visualizar y describir la morfología de neuronas individuales gracias a las impregnaciones de Golgi, distinguiendo entre células de proyección a larga distancia y células de proyección local o interneuronas. Pero el avance más importante introducido por Cajal fue la descripción detallada de las terminaciones de estas células talámicas individuales en la corteza cerebral, identificando inicialmente las arquitecturas

simples restringidas a capas corticales intermedias procedentes de núcleos primarios de relevo, denominado sistema TC “específico” (Kolliker 1896). Junto con la tinción de Golgi, se comenzó a usar la técnica de Marchi para el marcado anterógrado de fibras nerviosas mielinizadas que han degenerado, mediante la cual se caracterizó por primera vez la proyección genículo-cortical en la rata (Lashley 1934). Posteriormente, se continuó profundizando en el estudio de las conexiones TC utilizando el método de degeneración celular retrógrada en regiones corticales, lo que permitió observar que algunos núcleos talámicos como el dorsomedial (MD) no recibían información de cortezas sensoriales sino de cortezas frontales y cinguladas (Monakow 1895), así como regiones corticales insulares que no recibían aferencias talámicas al no apreciarse degeneración en ningún núcleo talámico al ser lesionadas mediante estimulación eléctrica (Frontera 1956). Pero realmente hasta los trabajos de Lorente de Nó (1938), no se describieron otros tipos de arquitectura de neuronas TC. Gracias a ellos, se observaron proyecciones finas aferentes del tálamo a la capa 1 cortical en roedores, definiéndose así un sistema TC “difuso”, ya que no mostraba un plexo terminal en corteza tan denso como el sistema “específico” (Figura 2).

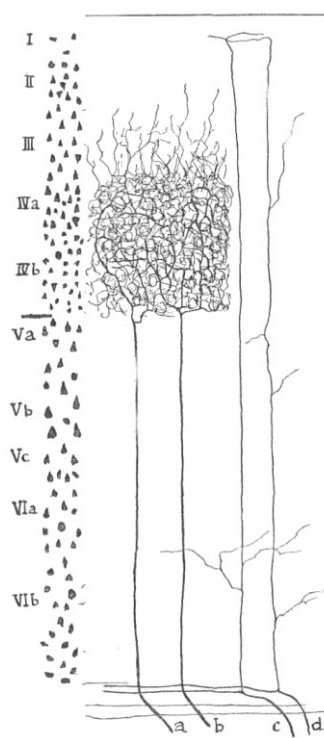


Figura 2. Distribución laminar de los axones TC específicos (a, b) e inespecíficos (c, d) en la corteza cerebral de ratones postnatales (p11). En el lado izquierdo se observa una representación de la tinción de Nissl mostrando las distintas capas corticales. Las fibras específicas (a, b) marcadas con tinción de Golgi ascienden hasta la capa 4 donde se dividen profusamente formando un plexo intracortical que puede ocupar hasta la capa 3. Las fibras TC inespecíficas (c, d) van a inervar al menos dos áreas corticales continuas ascendiendo hasta la capa 1 y dejando en ocasiones colaterales en todas capas, aunque en menor medida en capa 6. Modificado de Lorente de No (1938).

Con este hallazgo, se comenzó a combinar la degeneración retrógrada y el registro de potenciales evocados por estimulación periférica (Rose y Woolsey 1949a), con lo que se pudo concluir la existencia de una relación, de estrecha dependencia, entre el tálamo y la corteza. Estos estudios son de elevada importancia ya que con ellos se propuso la división del tálamo en tres categorías. Los núcleos “extrínsecos” (grupo nuclear ventral, anterior y cuerpos

geniculados) que recibirían aferencias sensoriales y proyectarían de forma “específica o esencial” hacia áreas corticales primarias sensoriales, motoras y límbicas. Los núcleos “intrínsecos” (grupo nuclear medial, lateral, posterior, intralaminares y de la línea media) que recibirían aferencias principalmente de otros núcleos talámicos y que proyectarían de forma “inespecífica o como refuerzo” a áreas corticales asociativas, aunque más tarde se observó que algunos de ellos como los núcleos intralaminares, también proyectan al estriado (Jones y Leavitt 1974; Macchi et al. 1996; Jones 2007). Por el contrario, estaban los núcleos intralaminares anteriores y de la línea media, cuyas proyecciones no eran apenas conocidas (Rose y Woolsey 1949b).

A través de estos estudios, comienza a emerger la idea de que un axón TC puede inervar un área cortical (“proyecciones fundamentales”), e incluso dividirse inervando así más de un área cortical con igual o distinta intensidad (“proyecciones de mantenimiento”) basándose en el grado de degeneración producida en un núcleo talámico tras la destrucción de un área cortical específica (Rose y Woolsey 1949b; Royce 1983). Estos métodos de degeneración retrógrada se continuaron utilizando hasta la aparición de las técnicas sensibles de transporte axoplásmico anterógrado y retrógrado actuales (Macchi et al. 1996). Estas técnicas han permitido determinar que los núcleos talámicos no tienen conexiones intrínsecas, y aunque la mayoría reciben aferencias de regiones subcorticales y sus conexiones con la corteza son recíprocas, algunos núcleos talámicos no proyectan al estriado (Str, Jones 2007). Para el estudio de las aferencias talámicas y la reciprocidad de los sistemas de proyección TC, se ha utilizado en gran medida el método de degeneración axónica combinado con impregnación argéntica de Nauta (Nauta y Gyax 1954) complementado con el registro con microelectrodos, promoviendo el estudio a través de microscopía electrónica de la organización sináptica, por ejemplo, del LGN en el primate (Colonnier y Guillery 1964).

Gracias a los avances en las técnicas electrofisiológicas, se pudo asociar el denominado sistema de proyección “específico” a núcleos talámicos de relevo de información sensorial a una o más áreas corticales, y las proyecciones “no específicas o difusas” a la ritmicidad talámica y cortical (Dempsey y Morison 1942). Esta relación se estableció debido a que tras estimulación eléctrica del tálamo, en el caso de las proyecciones TC “específicas”, se produce una respuesta “primaria” de corta latencia en áreas corticales primarias (Steriade, Datta, et al. 1990; Steriade, Jones, et al. 1990). Además, en el caso de una estimulación repetida a baja frecuencia, se puede producir inmediatamente después una respuesta “aumentada” o tipo 1 muy extendida, que se ha relacionado con neuronas que proyectarían a capa 5 (Castro-Alamancos y Connors 1996; Steriade 2003; Jones 2007). La respuesta electrofisiológica de las proyecciones “no específicas” a estimulación talámica de baja frecuencia se denomina “reclutante” o tipo 2 y se caracteriza

por largas latencias (debido a que sus proyecciones son principalmente a capas corticales superficiales), extendiéndose a múltiples áreas corticales, por lo que se le ha atribuido al tálamo funciones de control cortical del estado de alerta y de la consciencia por el tálamo (Jasper 1949; Hanbery y Jasper 1954). Ambas respuestas pueden modularse mutuamente en función del estímulo aferente, pero éstas últimas se han relacionado con cambios en el estado de consciencia, atención y cognición. Desde el punto de vista anatómico, la proyección TC “específica” es minoritaria y extiende su campo terminal axónico en la capa 4 cortical en una única área cortical primaria, manteniendo en sus proyecciones la topografía de la información sensorial que vehiculan. Mientras que la proyección TC “inespecífica”, estaría caracterizada por inervar la capa 1 dejando múltiples colaterales a su paso por el resto de capas corticales (Lorente de No 1938; Jones y Burton 1974; Jones 2007).

Las técnicas incipientes de trazado axónico anterógrado mediante autoradiografía a nivel ultramicroscópico permitieron caracterizar el modelo de terminación de aferentes sensoriales a un núcleo con un sistema de proyecciones TC de tipo “específico”, como por ejemplo, la sinapsis retino-geniculada en primates (Hendrickson 1969). Este nuevo método de trazado permitió la visualización de gran cantidad de arquitecturas de las neuronas TC, diversos patrones de distribución laminar y tangencial que dieron lugar a clasificaciones más amplias de estos sistemas de proyección. Entre estos trabajos, son de especial interés los realizados por Herkenham en roedor utilizando aminoácidos tritados como trazador (Herkenham 1978, 1979), ya que ayudaron a pasar de la concepción del sistema de proyección TC dual a una clasificación en cuatro categorías en función de su patrón laminar (Herkenham 1980a). La *categoría 1* de proyecciones TC “específicas” poseería un patrón de terminales en capas intermedias (capa 3-4) y en ocasiones una escasa inervación de las capas 1 y 6, y proceden de los núcleos VP, MGN, LGN y DM. La *categoría 2* poseería un patrón de terminación en capas profundas (5 y especialmente 6) y cuyo origen estaría en los núcleos intralaminares. Y por último, las *categorías 3 y 4* distribuirían sus terminales axónicos principalmente en capa 1 y de forma ocasional a otras láminas corticales, perteneciendo a esta categoría los núcleos VA, LD, VM, LP, Po y reuniens, localizados de forma adyacente a los núcleos intralaminares (Herkenham 1980a).

Posteriormente, con el uso de trazadores retrógrados como la peroxidasa de rábano conjugada (HRP) o sustancias fluorescentes se demostró la existencia de varios núcleos talámicos con proyecciones “difusas” descritas previamente y que se extendían en varias dianas corticales (Jones y Leavitt 1974; Macchi et al. 1984; Jones 2007).

Más tarde se comprobó que un mismo núcleo de relevo, como es el LGN en primates, posee distintos tipos de neuronas TC segregadas en grupos en el núcleo, que proyectan a distintas láminas de la corteza visual primaria (V1) (Hubel y Wiesel 1969, 1972). Y con abordajes de

marcado poblacional con HRP (Fitzpatrick et al. 1983) y de neurona única (Florence y Casagrande 1987) se ha comprobó que estas neuronas fuera de V1 invierten exclusivamente la capa 1, lo que no se había apreciado con estudios de autoradiografía anteriormente (Harting y Huerta 1983). Así, este último hallazgo abre la posibilidad de que una misma área cortical esté recibiendo proyecciones de múltiples núcleos talámicos, por lo que el grado de convergencia y divergencia de estas conexiones podría ser mayor del esperado. En base a los estudios de trazadores anterógrados y retrógrados en primates y gatos (Macchi y Bentivoglio 1982; Macchi et al. 1983; Minciacchi et al. 1985; Rausell 1991), el tema de la clasificación de las conexiones TC fue revisado (Macchi et al. 1996), y se propuso una clasificación de estos patrones de proyección considerando aspectos citológicos, fisiológicos, histoquímicos y hodológicos, así como de las tres principales funciones talámicas (de relevo, moduladora e integradora), reconociendo cuatro clases de núcleos talámicos (Figura 3).

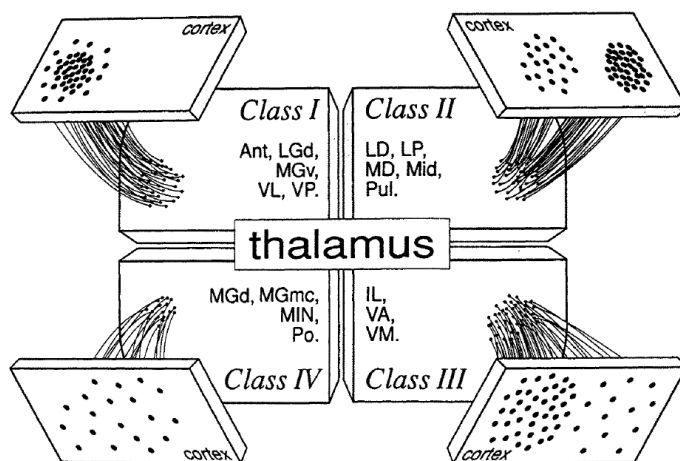


Figura 3. Esquema de los patrones de proyección TC en el gato en función del grado de especificidad o dispersión en corteza. Clase I: núcleos que proyectan densamente a un área cortical. **Clase II:** núcleos que proyectan densamente a un área y difusamente a otra. **Clase III:** núcleos que proyectan difusamente a varias áreas corticales pero con campos terminales restringidos a una región dentro de ella. **Clase IV:** núcleos que proyectan de forma difusa y extensa a varias áreas corticales. Tomado de Macchi et al. (1996).

Simultáneamente, se enuncia una nueva clasificación de las proyecciones TC en base a las propiedades neuroquímicas de las neuronas TC que expresan las proteínas ligadoras de calcio, parvalbúmina o calbindina (CB) en primate (Jones y Hendry 1989). Además, mediante el estudio de la morfometría de los somas de estas neuronas de proyección en los distintos núcleos talámicos de carnívoros y primates tras ser marcadas con trazadores retrógrados localizados en capa 1 y en capas profundas, se observaron claras diferencias en el tamaño del soma de las neuronas que invierten la capa 1 en comparación con las neuronas "específicas" que invierten la capa 4. Gracias a esto se pudo determinar que estas neuronas "no específicas" que proyectan a capa 1 se encuentran de forma ubicua en los distintos núcleos talámicos de manera exclusiva o entremezcladas con las neuronas de proyección "específica", formando un sistema proyectante a capa 1 o "LIPS" (Rausell y Avendaño 1985; Avendaño et al. 1990).

Con todos estos datos, Jones (2001) propuso la existencia de dos tipos básicos de neuronas TC. Por un lado, las neuronas de proyección “difusa” que alcanzarían varias áreas corticales sin una organización topográfica aparente, denominadas “*matrix*” (usaremos por consenso siempre los términos originales en inglés, ya que en algunos casos sus traducciones al castellano pierden o alteran parte de su significado), que se distribuirían por todos los núcleos talámicos y expresan calbindina (en primates). Mientras que, sólo en algunos núcleos, habría mayoritariamente, neuronas con proyecciones aferentes y eferentes topográficamente organizadas que alcanzarían capas intermedias (3-4) de un área cortical de forma focal, y se denominan neuronas “*core*” (expresan parvalbúmina en primates y poseen alta actividad de la enzima citocromo oxidasa) (Jones 1998, 2002) (Figura 4). Además introduce el concepto de colateral axónica, aunque los estudios de doble marcado retrógrado con trazadores fluorescentes apenas aportan resultados concluyentes de la existencia de las mismas (Jones 1983).

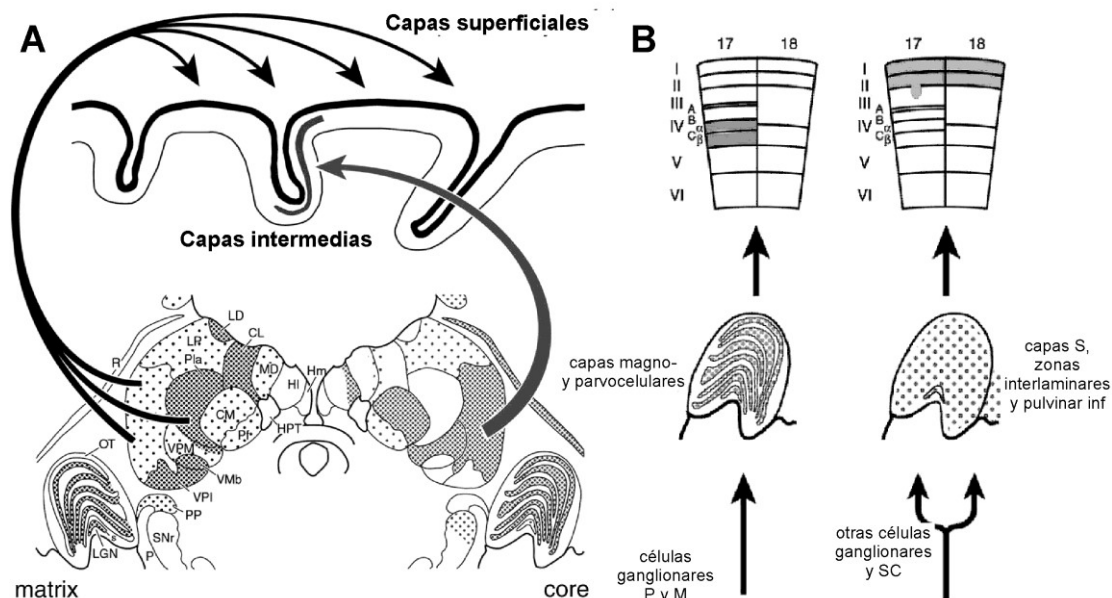


Figura 4. Tipos y distribución de neuronas tálamo-corticales en primate. (A) Esquema de la distribución y densidad relativa de las neuronas que expresan calbindina de tipo *matrix* (puntos grises) y que expresan parvalbúmina de tipo *core* (puntos negros) en una sección coronal del tálamo de primate. Obsérvese la distribución diferencial de ambos tipos de poblaciones neuronales en los distintos núcleos talámicos, junto a los dos patrones distintos de distribución tangencial de sus proyecciones de una forma más extensa en múltiples áreas (*matrix*) o focalizada terminando en sólo una (*core*). (B) Esquema de los diferentes tipos de aferencias subcorticales que reciben ambos sistemas y la arborización de sus axones en capas corticales diferentes, como se muestra en las distintas capas del LGN. Como muchos otros núcleos de relevo, el LGN presenta una mezcla de ambos tipos de neuronas TC organizadas en este caso en capas diferenciadas. Modificado de Jones (2002).

A finales del siglo pasado, se introducen de trazadores neuronales eficientes cada vez más selectivos y precisos, por lo que aportan una mayor resolución en la visualización del marcado axónico anterógrado y retrógrado, y una disminución del tamaño del depósito. Entre estos trazadores se incluyen la fitohemaglutinina-L de la planta *Phaseolus vulgaris* (PHA-L), los dextranos biotinilados (BDA), el trazador bidireccional HRP conjugado con aglutinina del germen

de trigo (WGA), otros trazadores derivados de la biotina, trazadores fluorescentes como el fast-blue (FB), fluorogold (FG), carbocianinas como diamidino yellow (DiI), así como la subunidad de B de la coleratoxina (CTB) administrado libre o conjugado con moléculas fluorescentes (Papadopoulos y Dori 1993; Angelucci et al. 1996; Köbbert et al. 2000; Reiner et al. 2000; Vercelli et al. 2000). A todo ello se suma la introducción de una gran variedad de vectores virales que dependen de la interacción de muchas variables como el tiempo de inyección, periodo de supervivencia, velocidad de transporte, sensibilidad y eficacia del trazador (Chamberlin et al. 1998; Wu et al. 2003). Todos ellos son algunas de las múltiples moléculas que se han utilizado como trazadores en los últimos años, que unido a los avances en el campo de la microscopía óptica y electrónica incrementó en gran medida el número de estudios sistemáticos de mapeo de proyecciones neuronales, revelando los principios básicos de la conectividad cortical areal y laminar de múltiples núcleos talámicos (Arbuthnott et al. 1990; Wouterlood et al. 1990; Berendse y Groenewegen 1991; Van Groen y Wyss 1992; Lu y Lin 1993; Shibata 1993).

En nuestro laboratorio se han utilizado varios de estos trazadores para determinar el origen y grado de convergencia de las proyecciones de este sistema TC “difuso” a capa 1 o LIPS, así como determinar la presencia de clasificación neuroquímica de *core/matrix* de las proyecciones TC en roedores (Jones 2002; Rubio-Garrido et al. 2007). Estos estudios muestran la gran divergencia de las proyecciones de tipo *matrix* que inervan un gran número de áreas corticales de forma organizada y no “difusa”, originadas principalmente en los núcleos VM, LP, VA y Po, aunque aparecen de forma ubicua en todos los núcleos talámicos. Además, se demuestra que a pesar de que las neuronas TC del tálamo de roedores no presentan inmunoreactividad para parvalbúmina, sí se conserva la distribución de terminales axónicos talámicos en corteza descrita para los dos tipos de sistemas de proyección *core* y *matrix* (Rubio-Garrido et al. 2009).

Posteriormente, han aparecido más clasificaciones de las proyecciones TC. Cabe destacar la fundamentada en la comunicación córtico-cortical transtalámica y en el tipo de aferencia cortico-talámica (CT) que va a recibir cada uno de los núcleos talámicos debido a la total reciprocidad de este sistema (Grieve et al. 2000; Sherman y Guillery 2006). Gracias a la recopilación de datos anatómicos y electrofisiológicos se ha determinado el importante papel que juega el tálamo en la comunicación córtico-cortical como nexo entre áreas corticales dentro de su sistema jerárquico basado en el flujo de la información aferente, desde áreas sensoriales, motoras y límbicas primarias hacia áreas asociativas. Este sistema jerárquico fue propuesto a raíz de la aparición de múltiples áreas corticales interconectadas en relación al sistema visual de primates, y se clasificaron así las conexiones entre estas áreas como *feedforward* si seguían el flujo de la información de áreas primarias (denominadas *first order* -FO) hacia asociativas (denominadas *high order* -HO), o *feedback* si su dirección era contraria al flujo de información

aferente (Van Essen et al. 1990; Felleman y Van Essen 1991; Callaway 2004; Lee y Sherman 2008).

Gracias a los trabajos del grupo de Sherman sobre la comunicación entre el tálamo y las áreas corticales relacionadas con el sistema visual y auditivo (Sherman y Guillery 1998, 2002, 2011; Murray Sherman 2001; Lee y Sherman 2008, 2011; Theyel et al. 2010; Guillery y Sherman 2011; Liu et al. 2014; Sherman 2016, 2017), se demostró el papel de las conexiones TC y CT en la comunicación en ambos tipos de direcciones propuestas entre las distintas áreas corticales. Los núcleos HO funcionan como un relevo indirecto entre áreas corticales denominándola vía indirecta transtalámica (Reichova y Sherman 2004; Sherman y Guillery 2011; Viaene et al. 2011a, 2011b). Desde el inicio de su trabajo, el grupo de Sherman observó distintos tipos de conexiones glutamatérgicas, proponiendo así una clasificación dual general de todos los aferentes talámicos (Figura 5), y otra particular de los tipos de fibras glutamatérgicas CT tomando como modelo de estudio el núcleo geniculado lateral dorsal (dLGN, Figura 4B, Sherman y Guillery 1998).

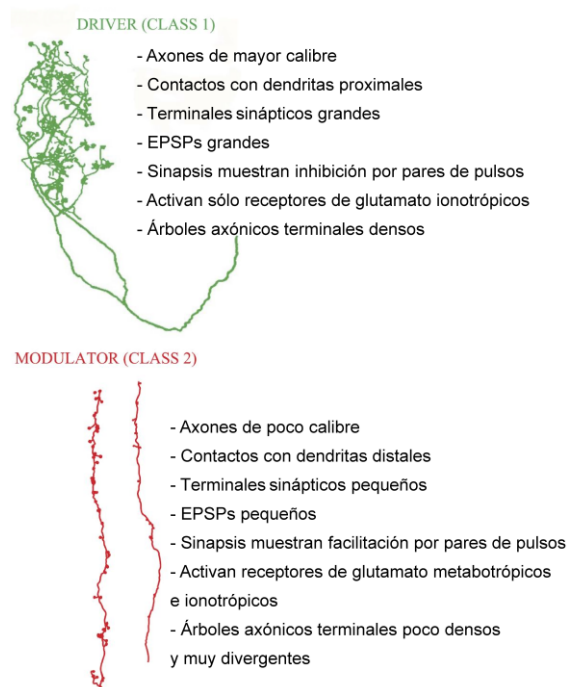


Figura 5. Resumen de las características anatómicas y electrofisiológicas de las aferencias *driver* o de tipo 1, y *modulator* o de tipo 2. Tomando en este caso para ejemplificar ambos tipos, los dibujos a cámara clara de un terminal axónico retino-geniculado (verde) y dos axones córtico-geniculado de capa 6 (rojo). EPSP (potencial postsináptico excitatorio). Modificado de Sherman y Guillery (2006, 2011).

Esta clasificación en proyecciones *driver* o clase 1 y *modulator* o clase 2, es la misma para los aferentes talámicos de origen cortical o subcortical. El término *driver* se asocia con proyecciones que transmiten información desde los receptores extero- e interoceptivos y algunos centros subcorticales (Bickford et al. 2015) hacia la corteza, definiendo las propiedades del campo receptivo en la neurona postsináptica. Están relacionadas con grandes potenciales postsinápticos excitatorios (EPSP) y con la inhibición por pares de pulsos que las caracteriza, asociándolo a una alta probabilidad de liberación de neurotransmisor. Mientras que las proyecciones *modulator* se caracterizan por cambiar el patrón de transmisión de la célula

postsináptica sin alterar las propiedades de su campo receptivo, donde se observan potenciales postsinápticos excitatorios de menor tamaño y menor probabilidad de liberación vesicular (Dobrunz y Stevens 1997; Sherman y Guillery 1998, 2011). Además en trabajos posteriores, se ha tratado de relacionar la aparición del receptor vesicular de glutamato tipo 1 presente en aferentes corticales y el receptor vesicular de glutamato tipo 2 (vGluT2) presente en terminales aferentes subcorticales, con el tamaño y las características estructurales de los terminales sinápticos en axones *driver* y *modulator* (Rovó et al. 2012). En cuanto a las aferencias talámicas procedentes de la corteza, se ha descrito que prácticamente todos los núcleos talámicos reciben aferencias CT de tipo *modulator* desde la capa cortical 6. Sin embargo, mientras que algunos núcleos de primer orden o de relevo sensorial (*first order*-FO) sólo reciben este tipo de aferencia cortical, otros núcleos talámicos también van a recibir aferencias CT desde la capa 5 además de las CT *modulator*, que denominan núcleos asociativos (*high order*-HO). Los terminales axónicos procedentes de la capa 5 parecen guardar gran semejanza estructural y sináptica con los aferentes primarios sensoriales denominados *driver* (Bourassa y Deschênes 1995; Sherman y Guillery 1996, 1998). De esta forma, se clasifican los núcleos talámicos como FO o HO en función del origen de su proyección *driver*. Así, los núcleos FO (como el dLGN) reciben esta aferencia dominante o *driver* desde estructuras periféricas y subcorticales (analizando, descomponiendo y reestructurando la información sensorial aferente de acuerdo con sus conexiones intrínsecas y extrínsecas desde otras estructuras encefálicas), mientras que los HO (como el complejo LP) reciben su aferencia *driver* desde la capa 5 de corteza cerebral para vehiculizarla hacia otra área cortical (Figura 6) (Sherman y Guillery 2011). Recientemente, estudios anatómicos y fisiológicos han demostrado que diferentes tipos de proyecciones *driver* pueden converger en una misma célula talámica. Ya que se ha observado que los terminales del colículo superior (SC) y de la retina convergen en las mismas células en el dLGN; dicha convergencia podría ser utilizada para integrar señales visuales y motoras (Bickford et al. 2015).

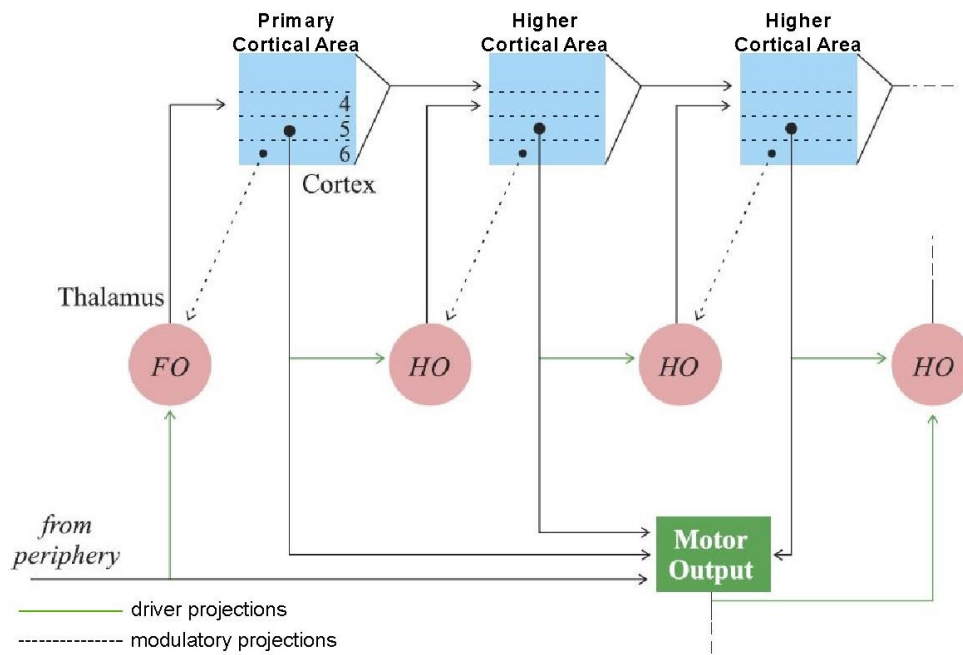


Figura 6. Esquema de las vías de comunicación cortico-cortical directa y transtalámica. La información asciende a la corteza a través del tálamo mediante proyecciones *driver* (verde). Se muestra la proyección de tipo *modulator* desde la capa cortical 6 (línea discontinua), en contraste con la proyección CT *driver* desde la capa 5, conectando así ambas vías paralelas de comunicación. Modificado de Sherman y Guillery (2011).

En cuanto al resultado de la clasificación de las proyecciones TC en base a este sistema *driver/modulator* es menos concluyente, ya que se ha relacionado el patrón de distribución laminar de las proyecciones tipo *core* (Jones 2002) en capas intermedias (3, 4) con las aferencias de tipo *driver*, y las proyecciones TC que terminan en capas superficiales (1, 2) con aferencias *modulator*, sin embargo, resulta difícil correlacionar las características anatómicas y funcionales sinápticas en los terminales de ambos tipos de proyecciones, como el número y tamaño de botones sinápticos estudiados en sus campos terminales axónicos que no permite concluir si una u otra proyección es la dominante (Van Horn y Sherman 2007; Viaene et al. 2011a, 2011b; Rovó et al. 2012).

3 ESTUDIOS DE LA ARQUITECTURA DE LAS PROYECCIONES TÁLAMO-CORTICALES EN NEURONAS INDIVIDUALES.

Durante las últimas décadas, la metodología desarrollada para el estudio del sistema TC ha sido decisiva para entender la forma y función de los circuitos neuronales. Desde las primeras tinciones histológicas que permitieron observar los terminales TC mediante el método de Golgi

(Lorente de No 1938), hasta desarrollar moléculas vivas o inertes que posibiliten el marcado selectivo de un grupo de neuronas o de una única neurona determinada con medidas funcionales para caracterizar las relaciones entre estructura y función de cada tipo neuronal descrito. Unas décadas atrás sólo se había logrado reconstruir el campo terminal de las neuronas TC con proyecciones axónicas limitadas a una única área cortical como las del LGN (Florence y Casagrande 1987). La introducción de herramientas informáticas para el procesamiento y toma de imágenes de encéfalos completos junto con métodos computacionales de manejo de este gran volumen de datos que han permitido la modelización de esta conectividad, lo que permite la predicción de respuesta de los circuitos neuronales tanto a nivel local como global de todo el encéfalo. Además, recientemente se ha incrementado la variedad de métodos de estudio anatómico a gran escala de la red de elementos y conexiones que conforman el encéfalo de mamíferos o conectómica, utilizando desde técnicas de imagen como la resonancia magnética hasta reconstrucciones tridimensionales de botones sinápticos mediante microscopía electrónica (Bopp et al. 2017; Rodríguez-Moreno et al. 2017). Esto es debido a que la expresión de un comportamiento complejo requiere la integración de múltiples aferencias sensoriales distintas, la sincronización de muchas eferencias motoras y la coordinación de la actividad de ambas en redes neuronales a gran escala, todo ello regulado por la cognición, la motivación y las emociones. El gran avance de la microscopía óptica se ha aplicado al mapeo de la conectividad de todas las estructuras encefálicas del ratón mediante la reconstrucción de poblaciones marcadas con trazadores retrógrados o anterógrados con nuevos programas informáticos especializados, como Neurolúcida, y construir así nuevos atlas de alta resolución (Reid 2012; Osten y Margrie 2013; Zingg et al. 2014; Bota et al. 2015).

El último paso para conseguir la máxima resolución en el análisis y posterior modelización de cada uno de los elementos de la compleja red que conforma el encéfalo sería lograr marcarlo en su totalidad inequívocamente de forma independiente y aislada, como propusieron en su momento Hubel y Wiesel: *“examine one by one of all the afferents projecting upon that cell”*. La posibilidad de marcar en su totalidad las complejas arquitecturas de las neuronas que conforman el sistema TC constituiría un paso decisivo para la clasificación precisa de estas proyecciones. Además permitiría dar finalmente respuesta a si las proyecciones TC no específicas, que son altamente divergentes en corteza (Guillery 2003; Guillery y Sherman 2011) e inervan el estriado y la amígdala, se deben a la existencia de poblaciones neuronales heterogéneas dentro de un mismo núcleo con patrones unívocos de proyección cortical o subcortical o, por el contrario, se deben a la presencia de colaterales axónicas que permiten a una misma neurona alcanzar todas las regiones corticales y subcorticales a las que se ha descrito

que proyecta este núcleo en su conjunto. Esta cuestión se abordó originalmente utilizando el doble trazado retrógrado en dos o más áreas corticales y subcorticales en varias especies de mamíferos (Spreafico et al. 1981; Jones 1983; Macchi et al. 1983, 1984, Bullier et al. 1984a, 1984b; Minciacchi et al. 1986; Sakai et al. 1998; Doron y Ledoux 2000). En la mayor parte de estos estudios, el número de neuronas doblemente marcadas era mínimo, por lo que se asumió que la presencia de colaterales era escasa en el tálamo, a pesar de la abundancia de colaterales axónicas observadas por Cajal en la sustancia blanca cortical (Kishan et al. 2008; Guillery y Sherman 2011). Esta subestimación de neuronas con axones ramificados en múltiples regiones corticales y subcorticales se debía, por un lado, principalmente a limitaciones técnicas basadas en la eficacia de transporte que presentan los trazadores retrógrados (Bentivoglio et al. 1980), y en la sensibilidad en su visualización bajo el microscopio de fluorescencia, o bien a la propia morfología de la neurona en las diversas áreas inervadas, que podría estar favoreciendo o no la captación del trazador.

Para conseguir el marcado de una única neurona mediante trazadores anterógrados en roedores se comenzó a utilizar el método de inyección intracelular asociado al registro electrofisiológico de la neurona (Jankowska et al. 1976; Horikawa y Armstrong 1988; Barrenechea et al. 1995), el cual presentaba múltiples inconvenientes, entre ellos está el daño que produce en la membrana celular de la neurona o la capacidad para marcar el dominio somatodendrítico y axones locales, pero no de larga proyección o multirramificados. Este método evolucionó en la técnica de inyección yuxtacelular (Pinault 1996), que combina el registro extracelular y la inyección del trazador por iontoforesis (biocitina o dextranos) a muy bajas intensidades de corriente y largos tiempos de inyección mejorando en gran medida la eficiencia y calidad del marcado axónico en varias estructuras corticales y subcorticales (Prensa y Parent 2001; Veinante y Deschênes 2003; Cebrián et al. 2005), así como en el tálamo de roedores (Nosedá et al. 2011), lo que permitió constatar la gran abundancia de neuronas TC multirramificadas. A pesar de todo ello, esta técnica posee muy baja tasa de éxito y no asegura el marcado completo de axones TC que inervan áreas muy alejadas entre sí y de forma poco profusa, lo que va a limitar en gran medida su uso (Veinante y Deschênes 2003; Monconduit y Villanueva 2005; Parent y Parent 2005; Matsuda et al. 2009; Oberlaender et al. 2012).

Recientemente, la introducción de vectores virales modificados con una alta tasa de replicación de su genoma para la expresión de proteínas reporteras marcadoras, como la proteína fluorescente verde (GFP), direccionadas a la membrana axónica o al citoplasma permite, por primera vez, la visualización completa de axones TC individuales sin importar el número o la distancia de las áreas que inerva. Entre estos vectores virales más utilizados para el

marcado neuronal, se encuentran los creados a partir de los virus DNA adeno asociados (AAV) utilizados principalmente para el marcado a nivel poblacional mediante iontoforesis (Chamberlin et al. 1998; Tamamaki et al. 2000; Harris et al. 2012; Castle et al. 2014; Hunnicutt et al. 2014; Oh et al. 2014; Wang et al. 2014) y los virus RNA Sindbis utilizados para el marcado de neuronas únicas TC desde múltiples núcleos talámicos mediante presión (Furuta et al. 2001; Kuramoto et al. 2009, 2015; Matsuda et al. 2009; Ohno et al. 2012; Nakamura et al. 2015). Con la finalidad de crear un método más eficiente para inyección de estos vectores virales causando el mínimo daño tisular, en nuestro laboratorio se ha adaptado la técnica de electroporación *in vivo* para introducir únicamente la hebra de RNA codificante para el vector viral directamente en la célula diana mediante un pequeño choque electrosmótico (Porrero et al. 2016).

Considerando todos estos estudios de neurona única mencionados, junto con los datos de neurona única preliminares de esta tesis, nuestro grupo ha propuesto una nueva clasificación de las neuronas de proyección TC (Clascá et al. 2016). Esta clasificación se basa en que el análisis de los fenotipos morfológicos de axones TC predominantes, descritos hasta ahora, determinará su papel funcional (Clascá et al. 2012, 2016). Además, cabe destacar, la aparición de ramas colaterales intratalámicas se da de forma excepcional en el núcleo intralaminar centromedial (CM)-parafascicular (Pf) (Deschênes et al. 1996) y en el complejo LP (Nakamura et al. 2015). En base a ello se han propuesto cuatro categorías de proyecciones TC (Figura 7):

- Las neuronas TC “específicas” son características de los núcleos de relevo sensorial o FO tanto sensitivos (VP, dLGN, MGN) como motores (VL). Inervan una única área cortical o en ocasiones dos áreas, sin dejar colaterales en ninguna estructura subcortical, excepto en TRN. Cuando alcanzan la sustancia gris cortical arborizan de forma muy focal principalmente en las capas 3 y 4, por lo que pueden actuar como potentes conductores de la actividad cortical de forma precisa y topográfica (Sherman 2012), y de forma mucho más escasa en capas 1, 5 o 6 en función del núcleo.

- Las neuronas TC “multiespecíficas” parecen ser las más abundantes en roedores y se caracterizan por inervar de forma focal diversas áreas corticales próximas entre sí y, ocasionalmente, centros subcorticales como el estriado (Str) o la amígdala. Hay que destacar que el patrón laminar de estas neuronas varía entre las diversas áreas inervadas, permitiendo que una misma señal pueda computar de forma diferente en las distintas áreas a las que llega. Este tipo de neuronas tienen especial interés, ya que además podrían facilitar la sincronización de varias áreas corticales de la misma modalidad sensorial, así como regular los flujos de información entre ellas. Este tipo de neuronas aparece en los núcleos asociativos (HO), como la región lateral del complejo LP (LPL), la parte caudo-medial del complejo LP (LPMC), Po, LD y AV.

- Las neuronas TC “inespecíficas” se caracterizan por inervar, además de estructuras subcorticales como el Str, regiones muy extensas de la corteza arborizando en la parte superior de la capa 1, donde contactan con las dendritas apicales de las neuronas piramidales de las capas 2, 3 y 5. De esta forma van a conseguir controlar y regular la comunicación entre diversas áreas corticales muy alejadas entre sí, así como la salida de información de la corteza y su modulación por centros subcorticales a los que inerva. Este fenotipo aparece en núcleos como VM, VA, la parte rostro-medial del complejo LP (LPMR) y Re. En algunos casos parecen estar implicadas en la activación cortical ante diversos estímulos nociceptivos tanto somatosensoriales como auditivos o visuales, así como en la integración de aspectos cognitivos, emocionales y de motivación junto a la información de una o más modalidades sensoriales que reciben de su aferencia *driver* cortical. Esto puede ser explicado por el carácter altamente asociativo de estos núcleos (HO).

- Las neuronas “tálamo-subcorticales” se caracterizan por inervar de forma profusa el estriado, así como otras estructuras subcorticales como el núcleo entopeduncular o la amígdala, siendo la inervación cortical poco común y bastante dispersa, localizada principalmente en capas corticales profundas. Estas neuronas podrían estar involucradas en la modulación global de los circuitos de los ganglios basales. Se localizan principalmente en los núcleos intralaminares y de la línea media.

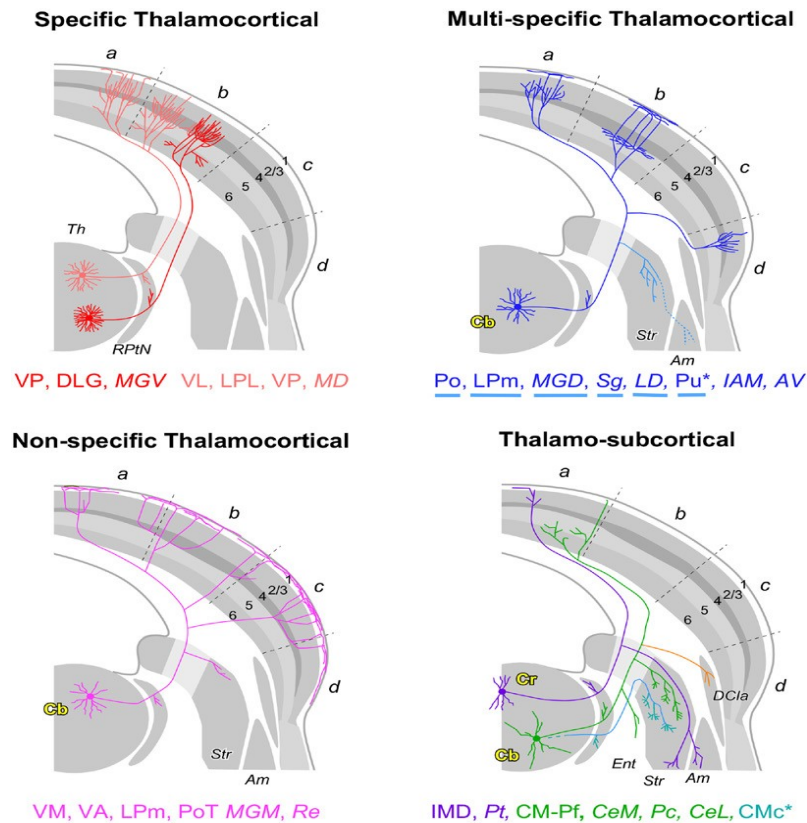


Figura 7. Representación esquemática de los morfotipos generales identificados de neuronas de proyección TC sobre secciones coronales prosencefálicas de mamífero. Los núcleos talámicos que poseen cada tipo neuronal se indican en la parte inferior del esquema en su color correspondiente, y en algunos casos un núcleo talámico puede contener más de una categoría de neuronas TC. En los casos en los que no aparece clara evidencia procedente de estudios de neurona única, aparece el nombre del núcleo en cursiva. Mientras que cuando una proyección subcortical de forma constante se ha subrayado el nombre del núcleo en un color distinto. Las letras “a-d” hacen referencia a cuatro áreas corticales modelo. La expresión diferencial de calbindina (Cb) o calretinina (Cr) en algunos tipos neuronales se ha identificado en las figuras. Ver lista de abreviaturas. Tomado de Clascá et al. (2016).

Es destacable que los estudios de las proyecciones TC que dieron lugar a dos de las clasificaciones consideradas de mayor relevancia de estas proyecciones (Jones 2002; Sherman y Guillery 2006) fueron llevados a cabo tomando como modelo de estudio los núcleos talámicos relacionados con el procesamiento de la información visual en roedores, carnívoros y primates: el núcleo dLGN y el complejo LP (complejo pulvinar en primates). Una razón es que el dualismo del sistema de proyección TC existente en el dLGN y en los distintos núcleos del complejo LP ejemplifican a la perfección tanto las primeras clasificaciones dicotómicas de las neuronas TC, como tres de las cuatro categorías descritas recientemente (Clascá et al. 2016). Ya que, como hemos mencionado, mientras que el núcleo dLGN se posiciona como modelo de proyecciones TC “específicas”, el núcleo lateral del complejo LP (LPL) y el núcleo caudo-medial (LPMC) se consideran “multiespecíficos” por innervar focalmente múltiples áreas corticales próximas entre sí de forma limitada. Por el contrario, el núcleo rostro-medial del complejo LP (LPMR) parece mostrar un sistema de proyección TC “inespecífico”, ha sido mucho menos estudiado y casi la

totalidad de datos de trazado neuronal proceden de modelos, especialmente, de primates en los que se ha observado que el complejo pulvinar parece presentar en términos generales, las características conectómicas similares a las del complejo LP de roedores (Leopold 2012; Bridge et al. 2016; Baldwin et al. 2017). Así, como se ha descrito estos núcleos asociativos mediales del complejo pulvinar, lejos de recibir, modular e integrar puramente información visual, van a estar recibiendo información bi- o multimodal, de varias modalidades sensoriales, motora y límbica, actuando como se ha propuesto en diversos trabajos como un gran centro integrador prosencefálico en muchos mamíferos (Bridge et al. 2016). A pesar de ello, a lo largo de la historia la mayor parte de estudios de proyecciones TC se han realizado sobre axones de tipo “específico” debido a que los dos principales objetivos de la neurociencia han sido determinar cómo se procesan y perciben los estímulos sensoriales por el encéfalo y cómo se integran para guiar acciones y decisiones (Glickfeld et al. 2014).

4 SISTEMA VISUAL DE ROEDORES

Desde el inicio de la neurociencia, el sistema visual se ha considerado el modelo por excelencia para el estudio del procesamiento sensorial (Pemberton 1891). Gran parte de estos estudios han sido realizados en primates y carnívoros han sido los modelos animales más utilizados para el estudio del sistema visual (Hubel y Wiesel 1962, 1968; Graybiel 1972) Esto es debido a que poseen una visión binocular completa, y a que al ser ágiles depredadores requieren de un sistema con gran complejidad y rápida coordinación en sus movimientos para desplazarse en su entorno. Sin embargo, se ha observado recientemente que el sustrato neural básico para el procesamiento visual no está limitado a carnívoros o primates, sino que todos sus componentes aparecen en el sistema visual de roedores (Huberman y Niell 2011). En las últimas décadas, como describiremos en los siguientes apartados, se ha estudiado el sistema visual en muchas especies distintas de vertebrados, pero recientemente los estudios experimentales se han concentrado en roedores. En este caso vamos a tomar como modelo el sistema visual del ratón para caracterizar los modelos de proyección TC desde el dLGN y el complejo LP (también referido como pulvinar) (Baldwin et al. 2017). Esto es debido a que en general el ratón ofrece muchas facilidades, no sólo que el repertorio de animales transgénicos y *knockout* es mucho más extenso para esta especie en la actualidad, sino que su tamaño, fácil manejo, alta tasa de reproducción, numerosas camadas y alta similitud genética con los humanos (aproximadamente

el 99% de genes humanos relacionados con el sistema nervioso central tienen homólogos en el ratón (Tecott 2003)) hacen de este animal un modelo de mamífero cada vez más utilizado para el estudio de muchos sistemas sensoriales (Chalupa y Williams 2008; Baldwin et al. 2017).

Debido a que se trata de un animal nocturno con ojos pequeños (3,3mm de diámetro), en el que probablemente predomine el uso de otros sistemas sensoriales como el somatosensorial, olfativo o auditivo para su supervivencia, se ha considerado que el sistema visual del ratón es simple con muy baja agudeza visual (Gianfranceschi et al. 1999). Sin embargo, esta asunción puede deberse a la falta de conocimientos sobre este sistema. Estudios demuestran que la densidad de células ganglionares retinianas (RGC) en la retina del ratón es mucho mayor que en ratas y conejos, y muy similar a la de gatos (Stone 1978). Además, apesar de tener menor agudeza visual que otros mamíferos diurnos, se ha comprobado que en su comportamiento los ratones utilizan su sistema visual en igual medida que el resto de sistemas sensoriales que poseen (Etienne et al. 1996). Es más, estudios de comportamiento en roedores (Prusky y Douglas 2003; Cruz-Martín y Huberman 2012) observan que pueden ser entrenados para realizar tareas visuales con rapidez y que recuerdan señales visuales, y reconocen formas específicas independientemente del contexto visual. Por esta razón, se han elaborado múltiples test para medir su capacidad visual en cuanto a la detección, discriminación de patrones, orientación y dirección del movimiento, y reconocimiento espacial de objetos en un contexto determinado (Pinto y Enroth-Cugell 2000). Los movimientos oculares en animales afoveales como el ratón, que tienen como funciones la estabilización de la mirada y la dirección de la mirada (sacadas, movimientos de vergencia para ajustar la distancia en que las líneas de visión convergentes de ambos ojos y movimientos de seguimiento suave de una determinada diana visual en un entorno) han sido también ampliamente estudiados (Stahl 2004). Además cada relevo del sistema visual de roedores comparte las principales características estructurales de campo receptivo como la de sus neuronas en la corteza visual primaria (V1), así como gran selectividad por la orientación. Todos estos aspectos han ampliamente descritos en los sistemas visuales de mamíferos superiores, por lo que lo convierte en un modelo válido para su estudio (Murphy et al. 2001; Niell y Stryker 2011).

También es necesario recordar aspectos básicos de la evolución de los principales órdenes usados en estudios del sistema visual (Figura 8). El orden de los roedores y los lagomorfos, como el conejo, son considerados taxones hermanos, y en conjunto se han considerado relacionados de forma muy próxima al grupo que engloba los órdenes de primates y escandentios (como tupayas) (Murphy et al. 2001; Kriegs et al. 2006). Por otro lado, el orden de los carnívoros al que pertenece el gato, el cual ha sido extensamente usado para el estudio del sistema visual, es un grupo taxonómico que ha sido propuesto como más cercano evolutivamente a los órdenes de

perisodáctilos (caballos), artiodáctilos (jirafas) y cetáceos (ballenas y delfines) que a los roedores y primates (Murphy et al. 2001; Kriegs et al. 2006; Chalupa y Williams 2008).

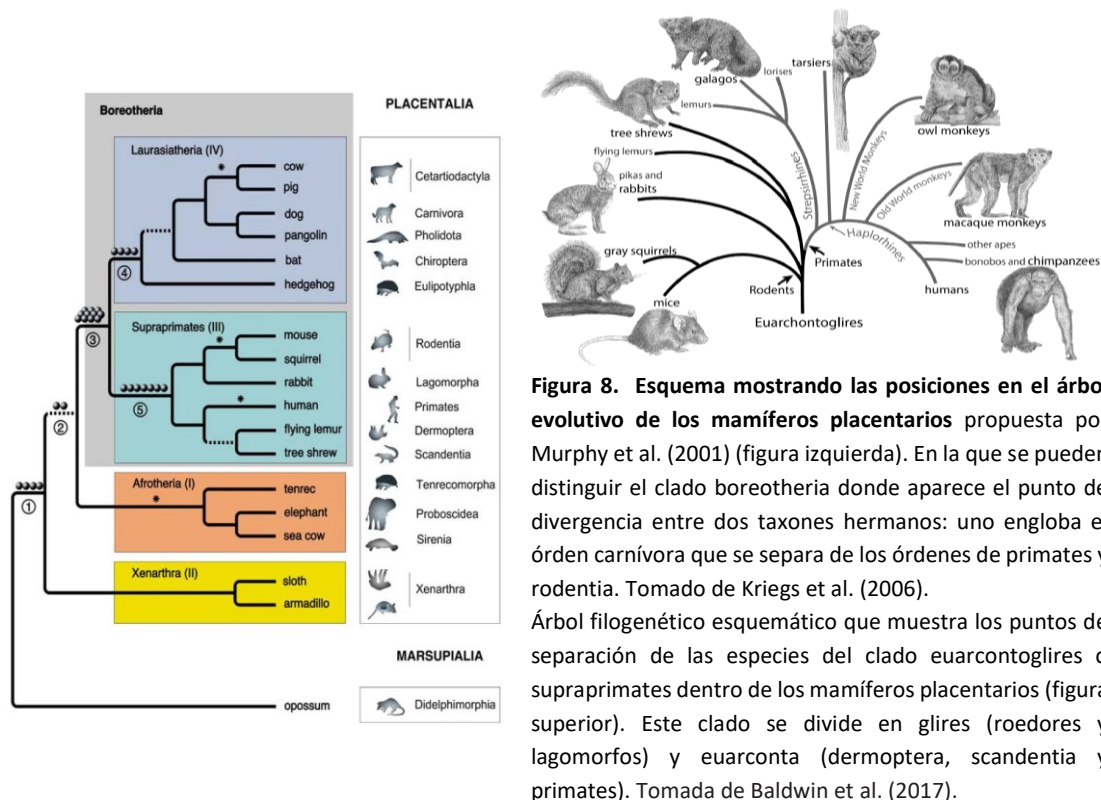


Figura 8. Esquema mostrando las posiciones en el árbol evolutivo de los mamíferos placentarios propuesta por Murphy et al. (2001) (figura izquierda). En la que se pueden distinguir el clado boreotheria donde aparece el punto de divergencia entre dos taxones hermanos: uno engloba el orden carnívora que se separa de los órdenes de primates y rodentia. Tomado de Kriegs et al. (2006). Árbol filogenético esquemático que muestra los puntos de separación de las especies del clado euarcontogliares o suprathere dentro de los mamíferos placentarios (figura superior). Este clado se divide en glires (roedores y lagomorfos) y euarconta (dermoptera, scandentia y primates). Tomada de Baldwin et al. (2017).

4.1 Componentes de las vías de procesamiento visual

Una de las principales razones por las que el sistema visual recibe tal interés en su estudio es porque la información visual es altamente dimensional, contando con multitud de aspectos asociados como la iluminación, contraste, forma, color y movimiento entre otros, que van a precisar de mecanismos de codificación de gran complejidad.

Para entender las conexiones TC encargadas del procesamiento de estímulos visuales, es necesario conocer los rasgos generales de las principales vías visuales directa (o geniculada) e indirecta (o extrageniculada) relacionadas con la formación de imagen en roedores (Figura 9).

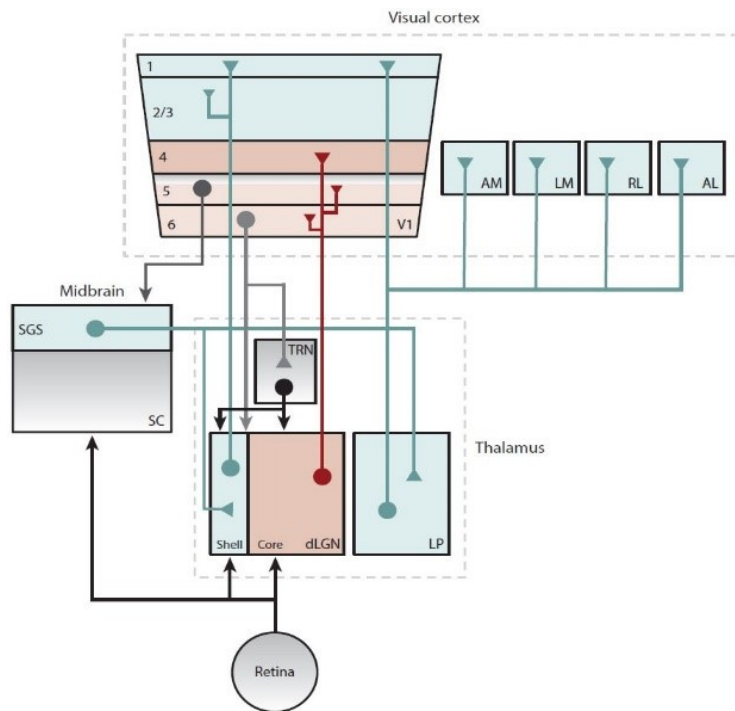


Figura 9. Esquema resumen de las dos vías principales encargadas de llevar la información visual desde la retina a las áreas visuales estriada y extraestriadas. Se indican las principales estructuras subcorticales implicadas directa o indirectamente en este circuito como son el dLGN, el SC y el complejo LP. Ver lista de abreviaturas. Tomado de Seabrook et al. (2017).

La información visual se procesa inicialmente en circuitos retinianos, desde donde se va a enviar hacia aproximadamente 46 estructuras del sistema nervioso central entre las que se encuentran núcleos del tálamo: dLGN, parte del complejo LP, la porción ventral del LGN (vLGN) y la lámina intergeniculada (IGL)) y pretálamo; colículo superior (SC), núcleos del área pretectal (APT), núcleos ópticos accesorios, regiones del prosencéfalo basal, complejo amigdalino (Amyg) y del hipotálamo (como el núcleo supraquiasmático); así como otras estructuras del tronco del encéfalo, llevando a cabo diversas funciones dentro de cada estructura diana (Morin y Studholme 2014). Pero en este trabajo nos centraremos en las estructuras talámicas implicadas en la vías directa e indirecta de transmisión de la información visual a las cortezas estriada (V1) y extraestriadas, dLGN y el complejo LP, aunque el SC va a verse implicado en ocasiones de forma indirecta (Figura 10). Es por esto, que comenzaremos describiendo las estructuras que van a conducir directa o indirectamente información hacia el tálamo visual (indicadas en la Figura 10), para finalizar profundizando en las conexiones del núcleo dLGN y el complejo LP (estructuras a las que dedicaremos un apartado específico por tratarse del tema central de esta tesis). Hay que indicar, que en ambos circuitos se va a conservar en cada estación de relevo en mayor o menor grado los mapas retinotópicos de la representación del campo visual y el mapa ocular de la cantidad de información procedente del ojo ipsilateral, del contralateral o de ambos, en cuyo interior se van a representar y procesar otros aspectos del estímulo visual como la orientación, la dirección y el gradiente monocromático (Seabrook et al. 2017).

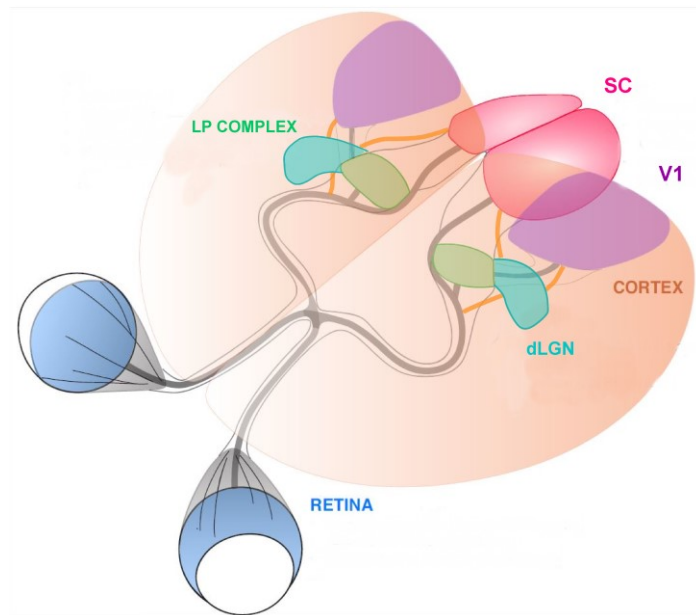


Figura 10. Esquema resumen de las principales estructuras encefálicas implicadas en las vías directa e indirecta del procesamiento de la información visual, que describiremos en mayor detalle en este apartado: retina, tálamo visual (dLGN y complejo LP), SC y V1. Ver lista de abreviaturas. Modificado de Thompson et al. (2017).

4.2 Retina

La retina de mamíferos ha sido ampliamente estudiada a nivel anatómico desde su marcado con tinción de Golgi (Ramón y Cajal 1900). La retina de roedores posee un área de 18mm^2 y $200\mu\text{m}$ de grosor, está estratificada en cinco capas, y no va a estar solamente formada por fotorreceptores y células ganglionares retinianas (RGC), sino también por interneuronas: células bipolares y amacrinas (de tipo on-off) que participan en el primer nivel de procesamiento y filtrado de la información visual aferente (Figura 11, Haverkamp y Wässle 2000; Chalupa y Williams 2008). Los roedores, como muchos mamíferos a excepción de los primates, no tienen un área foveal *per se*, pero sí un área central donde hay máxima concentración de conos. Los roedores poseen tres tipos de conos: S-UV (azules, expresan opsinas sensibles a 360nm), M (verdes, sensibilidad máxima a 580nm) y S-M (coexpresan ambos tipos de opsinas); bastones y RGC (Dräger y Olsen 1981; Nikonov et al. 2006). Además estos tres tipos de conos van a estar distribuidos de forma diferencial dorso-ventralmente en la retina para permitir el procesamiento selectivo de ciertos aspectos del campo visual superior e inferior adaptado a las condiciones de vida de los roedores (Szél et al. 1992; Applebury et al. 2000; Baden et al. 2013; Wernet et al. 2014). A pesar de ello, la proporción de fotorreceptores bastones (97%) es muy superior a la de conos, lo que es común en animales nocturnos (Carter-Dawson y Lavail 1979), a pesar de esto, los conos van a tener un importante papel en la retina de los ratones por su alto grado de convergencia aunque se encuentren en muy baja proporción. Sin embargo, la organización funcional y el circuito de la retina de roedores está altamente conservada en relación al resto de mamíferos tanto en la vía de los conos, como en las vías de bastones, que

constituyen el 97% de los fotorreceptores donde se produce la fototransducción (Berson et al. 2002; Protti et al. 2005). En la cepa de ratón C57BL hay aproximadamente 6,4 millones de bastones y 180000 conos (Katzner y Weigelt 2013).

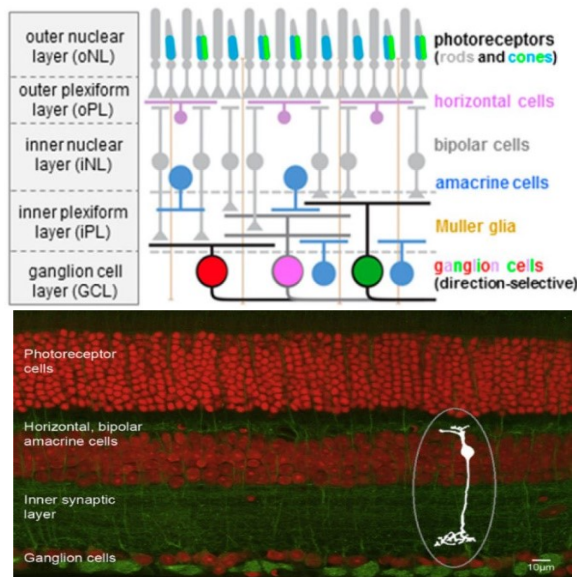


Figura 11. Resumen de la organización básica y arquitectura laminar donde aparecen representados los siete tipos celulares principales que conforman la retina del ratón (figura superior). Ver lista de abreviaturas. Tomada de Wernet et al. (2014).

Microfotografía de un inmunomarcado frente a las proteínas Syt2 (verde) y calretinina (rojo) que muestra las cinco capas de la retina (figura inferior). Ver lista de abreviaturas. Barra de calibración de 10µm. Tomado de Masland (2012).

La información visual sale de la retina a través de los axones de las RGC formando el nervio óptico. Una de las características más relevantes de las RGC de ratones es que poseen extensos campos receptivos con organización centro-periferia (Stone y Pinto 1993). Se han identificado aproximadamente 30 tipos de RGC en el ratón y cada una responde de forma específica a un aspecto concreto del estímulo visual aferente, ya sea a intensidad lumínica, a gradientes de gris y contrastes del objeto y el entorno, a una dirección u orientación determinada del movimiento o a estímulos amenazantes (Kong et al. 2005; Coombs et al. 2006; Masland 2012; Dhande y Huberman 2014a; Baden et al. 2016; Joesch y Meister 2016). Así, van a tener distintas funciones que van a condicionar sus morfologías somato-dendríticas, su densidad, sus tamaños y propiedades de campo receptivo y sus más de 40 dianas de proyección (Zhang et al. 2012; Hughes et al. 2013; Bleckert et al. 2014; Morin y Studholme 2014). Algunas RGC no formadoras de imagen (denominadas intrínsecamente fotosensibles), actúan como detectores de intensidad lumínica acoplando los ritmos circadianos endógenos y ciclos de sueño/vigilia a los ciclos de luz-oscuridad del ambiente y adaptando la constricción pupilar a ellos, otras RGC están implicadas en el direccionamiento de la cabeza y los ojos a una localización precisa del espacio, otras van a general pequeños movimientos en los ojos para ajustar la mirada tras estos movimientos de cabeza, y otras van a encargarse de formar la imagen del campo visual en la corteza a través del tálamo (Masland 2001; Hattar et al. 2003; Roska et al. 2006; Berson 2008; Schmidt et al. 2011; Dhande y Huberman 2014b; Demb y Singer 2015; Baden et al. 2016).

De este total, al menos 12 tipos de RGC (formadoras o no formadoras de imagen) proyectan a V1, ya sea a través del tálamo visual o del SC. Se ha comprobado recientemente que estas RGC van a transmitir sus propiedades específicas del campo receptivo de forma diferencial en función de su posición espacial en la retina (Godement et al. 1984; Badea y Nathans 2004; Hattar et al. 2006; Tan et al. 2015; Denman et al. 2017; Rhim et al. 2017).

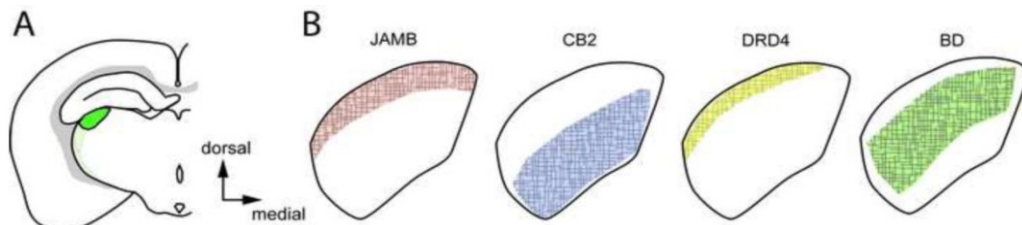


Figura 12. Tipos de RGC caracterizados en base a su patrón de terminación y función en el dLGN de ratón. (A) Localización del dLGN en una sección coronal. (B) Patrones de distribución laminar de los terminales axónicos de 4 tipos funcionales de RGC en el dLGN caracterizadas en 4 líneas transgénicas: JAMB (DSGC off), CB2 (RGCα off), DRD4 (DSG on/off) y BD (DSGC on/off). Tomado de Hong y Chen (2011).

Dos de los tipos de RGC formadoras de imagen más estudiados son las RGCα que se comportan como células α de primates y células Y en el gato (Stone y Pinto 1993), las cuales van a tener un importante papel codificando la frecuencia espacial; y las RGC selectivas de dirección (DSGC) de tipo on y on-off (Figura 12) (Carcieri et al. 2003; Sun y Kalloniatis 2006; Cruz-Martín et al. 2014). No hay evidencia de la existencia de distintas clases de RGC que presenten campos receptivos con propiedades de sólo sumación espacial lineal (células tipo P de primates) o sólo no lineal (células tipo M) en ratones, sino que la mayoría de campos receptivos de sus RGC muestran sumación lineal (Marrocco et al. 1982; Carcieri et al. 2003; Grubb y Thompson 2003). A pesar de la gran variedad de subtipos y alta densidad de RGC, la resolución espacial en ratones es bastante baja (0,4-0,5 ciclos/grado; Schmucker et al. 2005) en comparación con gatos (7-9 ciclos/grado; Blake et al. 1974), lo que principalmente es debido a la mayoría de sus RGC proyectan al SC, y sólo una subpoblación va a proyectar al dLGN formando la vía directa en su camino a V1 (Hofbauer y Dräger 1985; Chalupa y Williams 2008).

Los axones de las RGC que forman el nervio óptico van a decusar parcialmente en el quiasma óptico, la cantidad de axones que alcanzan el lado contralateral varía en función de la posición de los ojos en el cráneo. En el ratón es porcentaje de fibras que cruzan es alto y provienen de toda la retina, mientras que ipsilateralmente sólo permanecen entre el 2-3% de las fibras que componen el nervio óptico y todas proceden de la región periférica ventro-temporal de la retina donde el campo visual superior es mayor (Dräger y Olsen 1980; Gordon y Stryker 1996; Morin y Studholme 2014). En mamíferos diurnos con frontalización ocular completa como en los primates, las fibras ipsilaterales constituyen el 40% y también se sitúan en la retina temporal

(Perry y Cowey 1984). Esto va a condicionar los mapas de la representación de cada ojo en cada una de las estaciones de la vía geniculada (Figura 13) y extrageniculada, como explicaremos en los siguientes apartados.

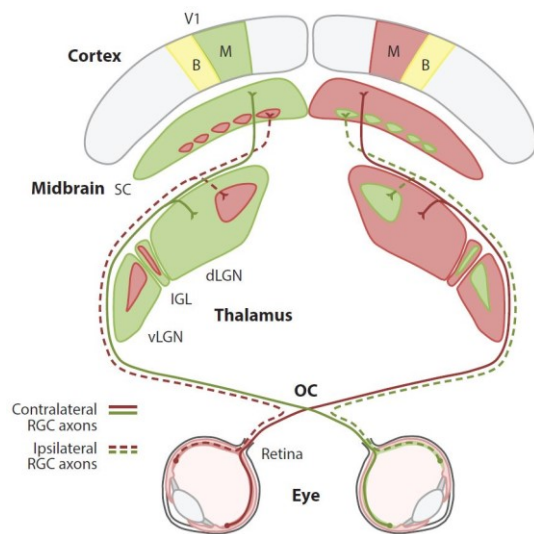


Figura 13. Esquema de la segregación de las proyecciones ipsilaterales y contralaterales procedentes de la retina derecha (rojo) e izquierda (verde) en cada una de las estaciones de relevancia de la vía directa o geniculada: dLGN, V1 y SC. Siguiendo el código de colores se observan las regiones de cada núcleo a las que llegan terminales ipsi- (línea discontinua) o contralaterales (línea continua). En V1 se indica también la región binocular (amarillo). En Ver lista de abreviaturas. Tomado de Seabrook et al. (2017).

4.3 Colículo Superior

El SC es una estructura del tronco del encéfalo que tiene un papel de elevada importancia en la integración sensori-motora, ya que va a recibir información de múltiples modalidades sensoriales y va a proyectar a muchas áreas motoras en mamíferos. En animales no mamíferos esta estructura se denomina techo óptico y es el principal centro de procesamiento visual, por lo que, desde el punto de vista filogenético, parte de esta función visual se ha conservado durante la evolución (Gale y Murphy 2014).

El SC presenta una marcada laminación desde la más superficial a la más profunda se observan el estrato zonal, estrato gris superficial (SGS), estrato óptico (OS), estrato gris intermedio, estrato gris profundo, estrato álbum intermedio y estrato profundo (Coizet et al. 2007). Pero la información visual va a ser recibida, procesada y enviada desde las capas superficiales (SGS, OS) (Lane et al. 1993). El trabajo de Langer y Lund (1974) fue el primero en describir mediante tinción de Golgi la citoarquitectura y conectividad local en el SC, así como la descripción de sus principales tipos neuronales.

La proyección retinofugal mayoritaria (80%) como hemos mencionado es hacia el SC (Hofbauer y Dräger 1985; Provencio et al. 1998). Esta proyección es tan masiva que incluso se ha observado que prácticamente el total de las aferencias al dLGN dejan colaterales axónicas en el SC, mediante estudios de transfección *in vivo* de células únicas en la retina (Dhande y Crair 2011; Ahmadlou y Heimel 2015; Ellis et al. 2016), o al menos dos tipos de RGC caracterizadas

genéticamente van a dejar terminales axónicos en dLGN y en SC (Rivlin-Etzion et al. 2011). Todo ello va a reflejar la importancia del elevado procesamiento de la información que poseen los ratones a nivel subcortical, en contraposición con los primates donde la vía retino-tectal constituye apenas el 10% de las proyecciones retinofugales (Perry y Cowey 1984).

Las proyecciones retino-coliculares tanto binoculares como ipsilaterales, las cuales llegan a la región rostro-medial en la parte inferior de OS, van a terminar siguiendo fielmente la organización retinotópica en las tres capas superficiales del SC (SGS, OS y en menor medida en el estrato zonal) formando un mapa bidimensional similar al de la retina pero con una rotación de 90° (Figura 14) (Cowey et al. 1982; Hofbauer y Dräger 1985; Mrsic-Flogel et al. 2005; Dhande et al. 2011). En el SGS se recoge un mapa completo del campo visual procedente de la retina contralateral, mientras que en el OS posee un mapa únicamente del cuadrante temporal inferior del ojo ipsilateral (Figura 15); en ambos estratos se ha comprobado que se realiza un procesamiento e incorporación diferencial de los distintos aspectos visuales (Dräger 1975a; Dräger y Hubel 1976; Furman et al. 2013; Xu et al. 2015). La principal función de esta porción superficial del SC es direccionar la cabeza y ojos hacia la localización del estímulo visual de interés, ya que posee mapas específicos de orientación selectiva (Ahmadlou y Heimel 2015; Feinberg y Meister 2015). Pero específicamente, las neuronas localizadas en SGS van a estar involucradas en el percepción de contornos y en la orientación de la respuesta (Girman y Lund 2007), mientras que las células del estrato óptico muestran selectividad por la dirección del movimiento (Dräger y Hubel 1976).

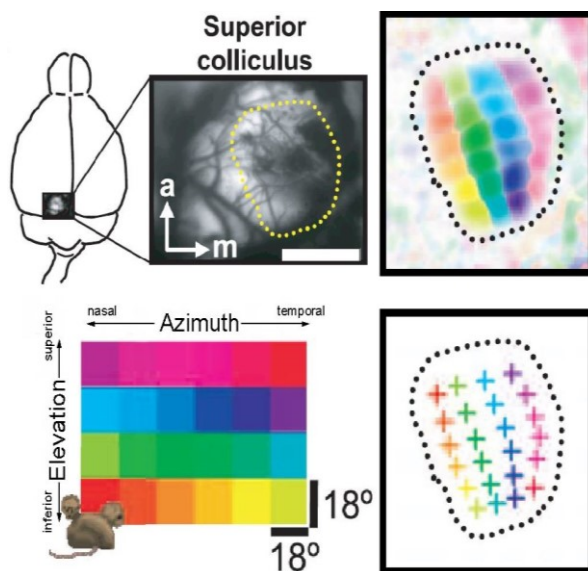


Figura 14. Mapa de la distribución retinotópica de los terminales retinofugales en el SC mediante imagen óptica intrínseca (IOI, Schuett et al. 2002). En el extremo superior izquierdo aparece una vista dorsal del encéfalo de ratón mostrando la localización de la ventana craneal que permite exponer la superficie del SC izquierdo mediante línea discontinua. Barra de calibración de 1mm. En el extremo inferior izquierdo se muestra el estímulo utilizado para mapear las respuestas del SC, cada color representa la posición de un estímulo. A la derecha de la figura, se muestran los mapas de la organización retinotópica del SC, donde cada color se relaciona con la posición del estímulo y el grado de saturación del mismo con la intensidad de la respuesta observada. El centro de las cruces se relaciona con la máxima respuesta. Modificado de Mrsic-Flogel et al. (2005).

Así, en ratones, la principal aferencia a las capas superficiales del SC proviene, además de la retina, de la capa 5 de las cortezas visuales estriada y extraestriadas ipsilaterales (Olavarria y Montero 1989), lo que va a tener un papel funcional muy importante en la modulación de las propiedades del campo receptivo de las RGC aferentes (Hashemi-Nezhad et al. 2003). Las principales dianas de sus proyecciones eferentes serán los principales núcleos del tálamo visual (dLGN, complejo LP) que describiremos con detalle en sus apartados correspondientes (Bickford et al. 2015).

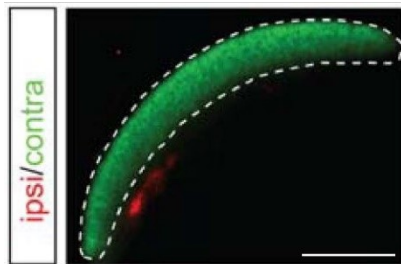


Figura 15. Distribución de los terminales axónicos retinofugales del colículo superior del ratón. Microfotografía que muestra sobre una sección coronal, los terminales axónicos marcados con un trazador fluorescente procedentes del ojo ipsi- (rojo) y contralateral (verde). Barra de calibración de 500µm. Tomado de Xu et al. (2015).

4.4 Divisiones y organización de las áreas visuales en ratón

En este punto, para comprender más tarde el sistema de proyección TC de los núcleos del tálamo visual, resulta imprescindible describir los rasgos generales de la organización de la corteza visual en roedores, tanto en el ratón como en sus parientes muridos (rata), esciúridos (ardilla), cricétidos (hámster) y cávicos (cobaya), cuyo estudio ha conducido al mapa actual de las cortezas visuales estriada y extraestriada.

La corteza estriada o V1 en el ratón ocupa entre 2 y 3mm² en la parte posterior del lóbulo occipital (Frost y Caviness 1980). A nivel citoarquitectónico, esta corteza se caracteriza por alta densidad de células granulares y con ello un aumento del grosor de la capa 4 (Rose 1929). Además se distingue de las cortezas extraestriadas circundantes por la baja densidad celular en la capa 5 y el aumento en capa 6 (Valverde 1968; Caviness 1975; Harting y Huerta 1983), por la alta actividad acetilcolinesterasa en capas 4 y 3, y su alta mielinización (Antonini et al. 1999). Gracias a estudios de enucleación (Valverde 1968) y técnicas de marcado transneuronal de axones con aminoácidos tritiados desde la retina (Drager 1974) se pudo delimitar con mayor precisión la corteza estriada de roedores. Se observó que esta corteza estriada y el anillo semicircular de cortezas extraestriadas circundante contenían campos retinotópicos completos y que sus neuronas respondían a barras luminosas en movimiento con una orientación determinada, por lo que también poseían un mapa de orientaciones preferentes (Dräger 1975b; Métin et al. 1988). Con toda esta información y considerando el mapa propuesto en rata (Krieg 1946), se propone un nuevo mapa de las áreas visuales del ratón en el que se identifican algunas

de las áreas localizadas en la corteza extraestriada (Caviness 1975). En la rata y el ratón se han descrito entre 6 y 8 áreas extraestriadas que siguen una disposición “centro-cinturón” (Diamond y Hall 1969), que han sido delimitadas mediante técnicas electrofisiológicas (Dräger 1975b; Tiao y Blakemore 1976; Choudhury 1978; Wagor et al. 1980; Espinoza y Thomas 1983) y anatómicas como el marcado de conexiones callosas o el uso de marcadores axónicos (Figura 16, Hughes 1977; Sefton et al. 1981; Olavarria y Montero 1984; Malach 1989; Coogan y Burkhalter 1990, 1993; Montero 1993).

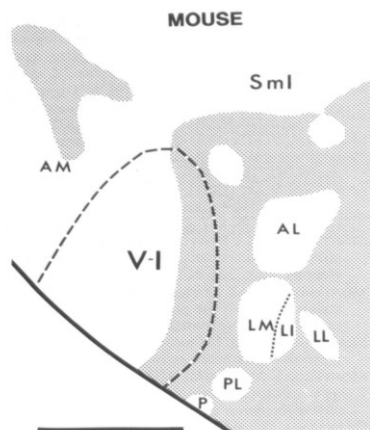


Figura 16. Representación de las áreas visuales en el ratón en una vista dorsal subdivididas en base a su patrón de conexiones callosas interhemisféricas. En estas regiones extraestriadas delimitadas por las conexiones callosas se van a distinguir las áreas LM, LI, PL y P (ambas actualmente denominadas P), LL (actualmente denominada POR), AL y AM. Ver lista de abreviaturas. Barra de calibración de 1mm. Tomado de Olavarria y Montero (1979).

Inicialmente todas estas áreas se recogieron bajo el nombre de área 18 de Brodmann cuya disposición coincidía con V2 de primates, ya que en estos forma un anillo abierto alrededor del área 17 o V1. Así mismo se subdividió esta área en 18a y 18b en función de su localización lateral o medial respectivamente al área 17 (Hughes 1977; Essen 1979; Caviness y Frost 1980), y se observó que la región lateral a V1 poseía una mayor complejidad (Figura 17, Montero et al. 1973).

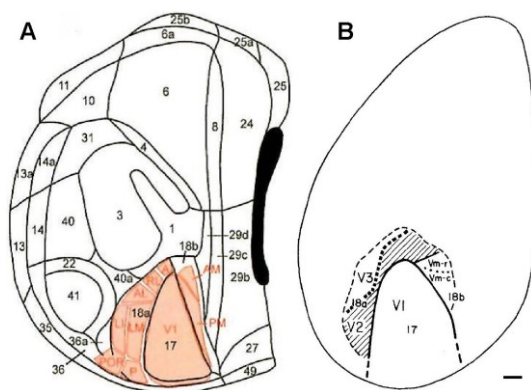


Figura 17. Hemisferios izquierdos del ratón donde se muestran dos modelos propuestos de la organización de sus áreas visuales estriadas y extraestriadas por Caviness y Frost (1980) (A) y Wagor (1980) (B). (A) En el cinturón periestriado rodeando el área 17 (V1) distingue las áreas 18a y 18b, donde se han superpuesto los contornos correspondientes a la delimitación de Wang y Burkhalter (2008). (B) Este modelo divide la corteza visual asociativa lateral 18a en V2 y V3, y la corteza medial 18b o Vm en las áreas Vm-r y Vm-c. Barra de calibración 0,4mm. Modificado de Chalupa y Williams (2008) y Wagor (1980).

Gracias al mapeo electrofisiológico de los campos receptivos en estas áreas, Wagor (1980) describió en la rata la existencia de dos campos retinotópicos completos en el área 18a, denominando V2 en el borde lateral con V1 que guardaría gran similitud con el área V2 de

primates (Essen 1979), y V3 en el borde lateral con V2. Mientras que en el borde medial con V1 se distinguió una región rostral y otra caudal (Vm-r, Vm-c), ambas dentro del área 18b o Vm (Figura 18). Así se demostró que estas representaciones del campo visual en cada área suelen revertirse en el borde limítrofe con V1 mediante mapeo electrofisiológico (Dräger 1975b; Tiao y Blakemore 1976; Choudhury 1978; Espinoza y Thomas 1983; Thomas y Espinoza 1987).

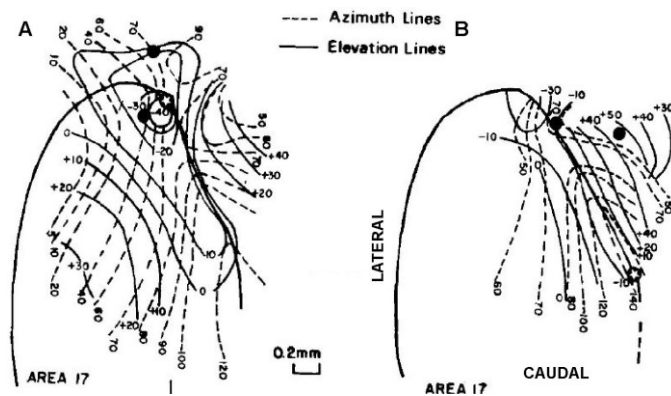


Figura 18. Representaciones de la vista dorsal de V1 en las que se han dibujado las líneas correspondientes a los grados de elevación (línea continua) y azimuth (línea discontinua) determinadas mediante registro electrofisiológico. En los bordes entre las áreas V1-AM (A) y V1-LM (B) se observa la inversión de estas líneas. Tomado de Wagor et al. (1980).

El estudio de Olavarria y Montero (1989) de las proyecciones entre V1 a otras regiones corticales extraestriadas utilizando aminoácidos tritiados demostró la existencia de entre 8 y 9 campos discretos dentro de la corteza extraestriada donde terminaban las proyecciones desde V1 (Coleman y Clerici 1980). Por homología con las áreas descritas en la rata, denominaron dentro del área 18a a las siguientes áreas: AL, LM, LI, LL, PL y P; mientras que medialmente en el área 18b identificaron las áreas: AM y S (denominada así debido a que limitaba con la región de S1 correspondiente a la representación de la cabeza).

Mediante el uso de técnicas más avanzadas como *intrinsic optical imaging* (IOI), corroboraron la hipótesis de Wagor (1980) sobre la existencia de un área V2 y V3, a las que añadieron lateralmente un área V4, mientras que el borde medial de V1 sólo se distinguía un área V5 (Figura 19B, Kalatsky y Stryker 2003). Casi de forma coetánea y utilizando la misma técnica, se describen dos áreas dentro de la región adyacente al borde lateral con V1 denominada en este momento como V2, estas áreas son LM y AL (Figura 19C, Schuett et al. 2002). Además constataron que el área V1 contiene una representación completa del hemicampo visual contralateral, como hemos mencionado, con el meridiano vertical cero representado en el borde con la región superior del área 18a (LM), y gradualmente líneas de azimuth mayores (que representan regiones más temporales del campo visual) se localizan cada vez más mediales en V1 hasta el borde con el área 18b (PM) (Dräger 1975b; Wagor et al. 1980; Simmons et al. 1982a; Kalatsky y Stryker 2003; Wang y Burkhalter 2007). Así, la representación del campo visual en V1 sería del cuadrante temporal inferior en regiones mediales de V1, la localización del cuadrante temporal superior en regiones caudales, la del cuadrante nasal

inferior en regiones rostrales y el nasal superior en regiones laterales de V1 (Dräger 1975b; Wagor et al. 1980; Simmons et al. 1982; Kalatsky y Stryker 2003; Wang y Burkhalter 2007; Chalupa y Williams 2008).

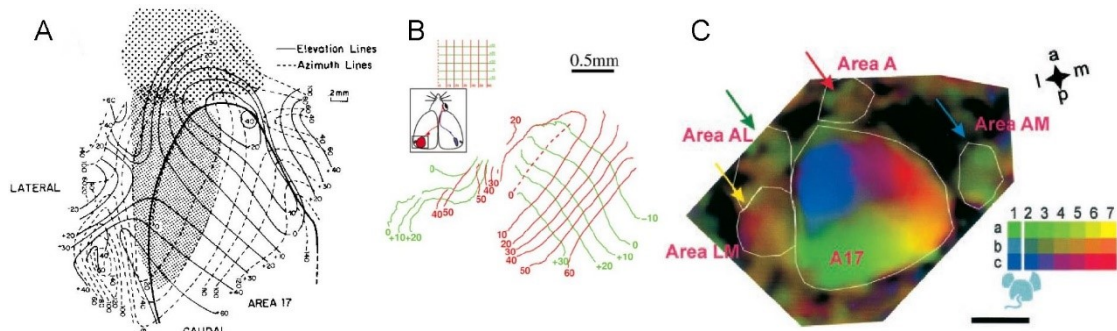


Figura 19. Tres modelos de representación de la retinotopía en una vista dorsal de las áreas visuales estriada y extraestriadas del hemisferio izquierdo del ratón. (A) Organización de líneas de isoazimuth (líneas discontinuas) e isoelevación (líneas continuas) obtenidas mediante registro electrofisiológico. Además se ha señalado la región binocular en el tercio lateral de V1 (color gris), mientras que la región cortical anterior marcada con un punteado se corresponde con el área cortical que responde a estímulos visuales y somestésicos de las vibrisas simultáneamente. Tomado de Wagor (1980). (B) Mapa de las líneas de isoelevación (verde) e isoazimuth (rojo) en V1 y las áreas visuales asociativas correspondientes al campo visual realizado mediante IOI. Tomado de Kalatsky y Stryker (2003). (C) Organización retinotópica de las áreas visuales obtenida mediante IOI, donde el código de colores se corresponde con la posición del estímulo en el campo visual y el nivel de saturación del color es proporcional a la intensidad de la señal de respuesta al estímulo. Como áreas extraestriadas distinguen LM, AL, A y AM. Ver lista de abreviaturas. Barras de calibración 2mm (A), 0,5mm (B) y 1mm (C). Tomado de Schuett et al. (2002).

Los trabajos anatómicos mediante la combinación de trazadores axónicos anterógrados (BDA o PHA-L) y de múltiples trazadores retrógrados (Wang y Burkhalter 2007) permitieron finalmente llegar a un consenso en la delimitación y nomenclatura de las áreas visuales asociativas del ratón, que hemos asumido en este trabajo (Figura 20). Observaron que en el ratón el azimuth 0° está representado en el límite de V1 con LM, donde aparece alta densidad de conexiones transcallosas en V1 en las capas 2 y 3, pero en el borde entre V1 y LM se incrementa tanto su densidad que se comunican también a través de la capa 5 y 6 (Yorke y Caviness 1975; Cusick y Lund 1981; Olavarria y Van Sluyters 1984; Olavarria et al. 1988; Olavarria y Montero 1989); por lo que el área considerada como similar en base a sus conexiones a V2 de primates que contiene un campo retinotópico completo sería LM. Este borde coincide con la región de V1 donde hay gran convergencia binocular (Simmons y Pearlman 1983a). En esta organización característica de “centro-cinturón” de la región extraestriada del ratón apoya la hipótesis sobre la evolución en los mamíferos de la corteza visual asociativa compleja compuesta por múltiples áreas extraestriadas cada una con una representación completa del campo visual, cuya disposición en torno a V1 está conservada en todos los mamíferos situándose en posiciones más cercanas a V1 en roedores y más alejadas en primates (Rosa y Krubitzer 1999).

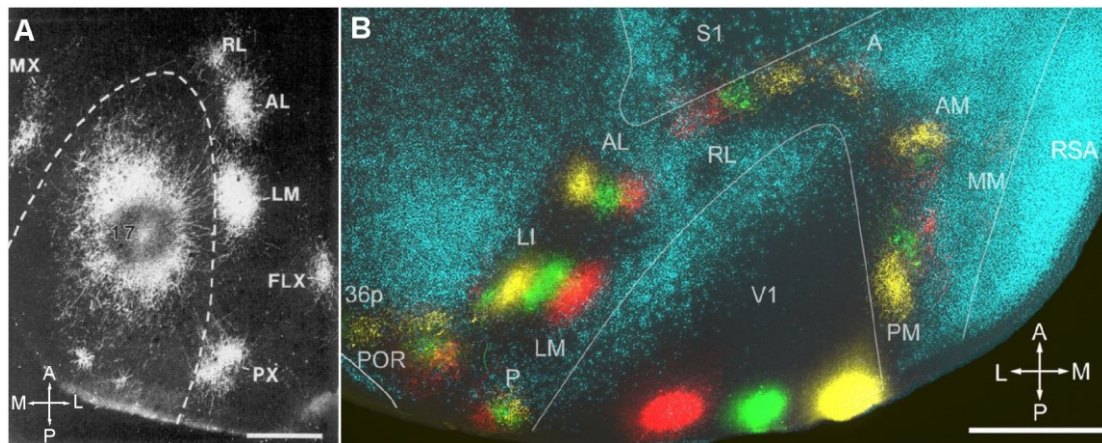


Figura 20. Delimitación de las áreas visuales extraestriadas en el ratón en base a su conectividad. (A) Microfotografía en campo oscuro de una visión dorsal del hemisferio derecho del ratón donde se representa un depósito de PHA-L en V1 (17) y sus proyecciones a las áreas extraestriadas LM, PX (actualmente denominado P), FLX (ahora LI), AL, RL y MX (ahora AM). (B) Visión dorsal del hemisferio izquierdo del ratón donde aparecen tres inyecciones de trazadores retrógrados distintos y se observan sus proyecciones ordenadas retinotópicamente en las distintas áreas visuales extraestriadas con distinta intensidad en función de la densidad de terminales en cada área. Las áreas visuales asociativas se han delimitado en función al patrón de conexiones callosas marcadas con bisbencimida (color azul). Ver lista de abreviaturas. Barras de calibración de 1mm (A, B). Modificado de Coogan y Burkhalter (1993) y Wang y Burkhalter (2007).

En la actualidad se consideran 9 áreas visuales extraestriadas en el ratón que incluyen campos retinotópicos completos (Figura 21) (Felleman y Van Essen 1991; Andermann et al. 2011; Marshel et al. 2011; Tohmi et al. 2014); 7 se encuentran conformando el área visual lateral anteriormente conocida como 18a o V2L (Franklin y Paxinos 2008) y una pequeña parte del área 36a o corteza ectorrinal (Ect, que pertenece a la región parahipocampal): LM, LI, P, AL, RL, A, POR; y las 2 áreas restantes constituyen el área medial 18b o V2ML: AM, PM (Olavarria y Montero 1989; Wang y Burkhalter 2007). Además la gran cantidad de conexiones callosas dentro de las áreas 18a y 18b han permitido trazar el resto de subdivisiones (Wang y Burkhalter 2007), con la ayuda de los estudios de IOI que han proporcionado la representación precisa de los campos retinotópicos contenidos en cada una de estas 9 áreas (Schuett et al. 2002). El área LM se ha considerado análoga a V2 de otros mamíferos en base a sus conexiones (Wagor et al. 1980; Rosa y Krubitzer 1999; Wang y Burkhalter 2007). Siguiendo el mismo criterio que en otros mamíferos, se denomina al área LI como V3, ya que la representación del meridiano horizontal en V2 se considera el borde con V3 (Wagor et al. 1980; Rosa y Manger 2005). En cuanto a las áreas denominadas por Wang y Burkhalter (2007) como RL y A adyacentes a la corteza parietal posterior rostral (PPtR), se consideran bimodales, por lo que van a tener campos receptivos visuales bien definidos y campos receptivos somatosensoriales difusos (Wagor et al. 1980), y se han denominado en conjunto en ocasiones como corteza parietal posterior dorsal (PPtD). Por el contrario, las regiones de la corteza extraestriada limítrofes con V1 medialmente, PM y AM,

contienen representaciones especulares del hemicampo visual temporal pero no del nasal (Wagor et al 1980, Chalupa y Williams 2008).

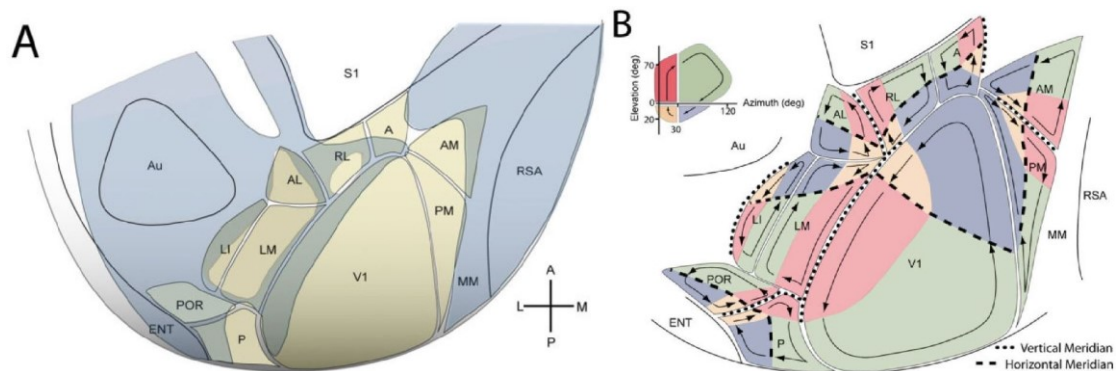


Figura 21. Representación esquemática de las áreas visuales primaria y asociativas sobre mapas planos de la visión dorsal del hemisferio izquierdo. (A) Se muestra la relación espacial entre el patrón de conexiones callosas (azul) y las áreas visuales delimitadas en función de la extensión de sus mapas retinotópicos en las 10 áreas visuales representadas. (B) Representación de los mapas retinotópicos de cada una de las áreas visuales estriada y extraestriadas construidos mediante el trazado axónico de las conexiones córtico-corticales entre todas las áreas visuales. Se muestran en distintos colores los cuatro cuadrantes del campo visual monocular, y las flechas indican la orientación de los mapas. Se han incluido las líneas de azimuth 0° en cada área (línea discontinua punteada) y de elevación 30° (línea discontinua). Ver lista de abreviaturas. Tomado de Wang y Burkhalter (2007).

Con el fin de establecer una organización funcional y jerárquica dentro de las múltiples áreas de corteza extraestriada descritas, se han llevado a cabo estudios de conectividad córtico-cortical entre las mismas. Tras los primeros estudios de este tipo utilizando WGA-HRP en rata (Malach 1989), se han utilizado trazadores más precisos como depósitos de BDA en V1 (Wang y Burkhalter 2007) muestran que no sólo proyecta de forma retinotópica a todas las áreas de corteza extraestriada, sino que también mandan terminales sin una organización clara a otras áreas corticales también visuales unimodales como son el área posterolateral 36p o corteza postrinal (POR), o asociativas bimodales como el área entorrinal (Ent) y perirrinal (PRh) localizadas lateralmente al área 18a, área entorrinal lateral (LEnt), la región de representación de la cara en S1, V2MM (MM según Wang y Burkhalter (2007)), corteza cingular primaria (Cg1), área retrosplenial disgranular (RSD) y con la corteza motora primaria (M1). Todas estas dianas corticales también se han descrito en rata (Miller y Vogt 1984; Coogan y Burkhalter 1993). Depósitos en LM y combinado con IOI, corrobora su analogía con V2 en este aspecto también, ya que proyecta a prácticamente todas las áreas visuales asociativas junto a temporales, parahipocampales, retroespleniales (RSD, RSG) e incluso auditiva asociativa y la región de los campos oculares frontales (FEF) dentro de Cg1 (Wang, Gao, et al. 2011a). Estos depósitos de BDA también se realizaron en el resto de áreas extraestriadas identificadas con la finalidad de caracterizar el flujo de información a través de las distintas áreas, y revelaron el claro sistema jerárquico de estas áreas visuales (Wang et al. 2012). Se ha observado que muchas de estas

áreas extraestriadas pueden continuar con el procesamiento visual en ausencia de V1 por sus amplias conexiones con otros núcleos talámicos, como el complejo LP y el SC, sugiriendo que las áreas extraestriadas reciben información visual en paralelo con V1 en roedores.

Otro rasgo característico observado, es que los campos receptivos visuales en cortezas extraestriadas son mayores que en V1, coincidiendo con carnívoros y primates. Y se observa que van a ir aumentando el tamaño de su campo receptivo de forma jerarquizada ($LM < POR < AL < P < LI < PM < AM < RL < A < MM$), así como al aumento en relación a su excentricidad dentro del área como sucede en V1 (Wang et al. 2007a; Wang y Burkhalter 2007). Por todas estas razones, la corteza visual del ratón se considera un buen modelo para estudios de conectividad y jerarquización entre áreas uni- y multimodales.

Tras observar las diferencias en la conectividad de estas áreas extraestriadas, se planteó la posibilidad de la existencia en el ratón de una corriente ventral y dorsal de procesamiento de la información visual (Ungerleider y Haxby 1994), y que las áreas LM y AL estuvieran contribuyendo por separado a una u otra. Estudios electrofisiológicos confirmaron que las neuronas de LM transportaban información de alta frecuencia espacial (Gao et al. 2006) hacia áreas extraestriadas laterales (LI, P, POR) con la finalidad de detectar cambios en el entorno y reconocimiento de objetos (Burwell y Hafeman 2003; Prusky y Douglas 2004; Davies et al. 2007; Chalupa y Williams 2008). Mientras que a nivel funcional AL vehicula información visual de baja frecuencia sobre cambios rápidos y objetos en movimiento hacia regiones polimodales de la corteza parietal posterior y lateral (Gao et al. 2006), así como hacia la corteza retrosplenial disgranular (RSD) y los campos oculares frontales para dirigir los movimientos de los ojos, cabeza y cuerpo y la navegación en el espacio (Taube 1998; Save et al. 2005).

4.5 Características de la corteza visual primaria

La corteza visual estriada o primaria (V1) constituye en roedores el área visual de mayor extensión, abarcando el 15% de la superficie total de la neocorteza, y va a contener un mapa retinotópico del campo visual (Figura 22) y otro de las aferencias procedentes de cada ojo. Como resultado de la colocación todavía bastante lateral de los ojos, la porción binocular de V1 constituye menos de la mitad de su área total, incluso se ha comprobado en ratas que poseen parches difusos de dominancia ocular funcional dentro de la región binocular de V1 (Chalupa y Williams 2008). A pesar de carecer de una frontalización ocular completa, no les impide tener una visión estereoscópica tridimensional como en primates y juzgar las distancias en profundidad de campo correctamente (Huberman, Feller, et al. 2008; Glickfeld et al. 2014).

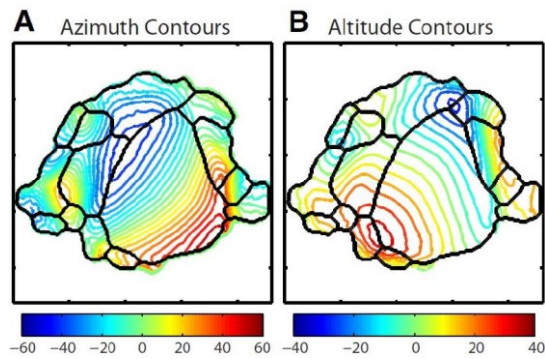


Figura 22. Mapa cortical retinotópico que muestra los contornos de las cortezas visuales primaria y asociativas sobre los que se representan las líneas de azimuth (A) y elevación (B) en grados. Se muestra la progresión del gradiente horizontal (A) desde campos temporales (rojo) a nasales (azul), y vertical (B) desde campos inferiores (rojo) a superiores (azul). Tomado de Garret et al. (2014).

A pesar de la baja cantidad de proyecciones ipsilaterales de las RGC, la región binocular de V1 ocupa aproximadamente el tercio lateral, donde se sitúa el campo visual nasal de ambos ojos. El 70% de las neuronas de V1 son binoculares (Dräger 1975; Métin et al. 1988), lo cual es sorprendente ya que sólo un 4-5% de las RGC proyectan ipsilateralmente (Dräger y Olsen 1980). Pero sin embargo, la proyección ipsilateral del dLGN se incrementa hasta un 14-18% de su volumen (Godement et al. 1984). El segmento binocular de V1 en ratones que ocupa el tercio lateral se distingue citoarquitectónicamente por su elevada actividad AChE, y su límite medial se corresponde con el campo visual nasal de azimuth 30-40° (Figura 23, Antonini et al. 1999). A esta región en el borde con el área visual LM, llegan proyecciones ipsilaterales del hemisferio visual superior entre 0° y 30-40° azimuth (Dräger 1975; Wagor et al. 1980; Simmons et al. 1982b; Herrera et al. 2003; Kalatsky y Stryker 2003; Wang y Burkhalter 2007; Koch et al. 2011; Wallace et al. 2013). Estudios electrofisiológicos demuestran que muchas de las neuronas localizadas en el segmento binocular van a responder preferencialmente a estímulos dirigidos al ojo contralateral (25%) que al ipsilateral (5%) (Dräger 1975b; Métin et al. 1988; Kalatsky y Stryker 2003), habiéndose comprobado que la información aferente contralateral posee mayor agudeza espacial (Salinas et al. 2017). Aunque en ningún caso se ha observado organización de estos tipos de neuronas formando columnas de dominancia ocular ni fisiológica ni anatómicamente, como ocurre en gatos (Fukuda y Stone 1974) o en primates (Hubel y Wiesel 1968). A pesar de ello, durante el desarrollo postnatal se ha observado un periodo crítico donde la representación de la retina ipsi- y contralateral en el segmento binocular de V1 se encuentra segregada y es sensible a la privación monocular (Dräger 1978; Gordon y Stryker 1996; Antonini et al. 1999; Chalupa y Williams 2008).

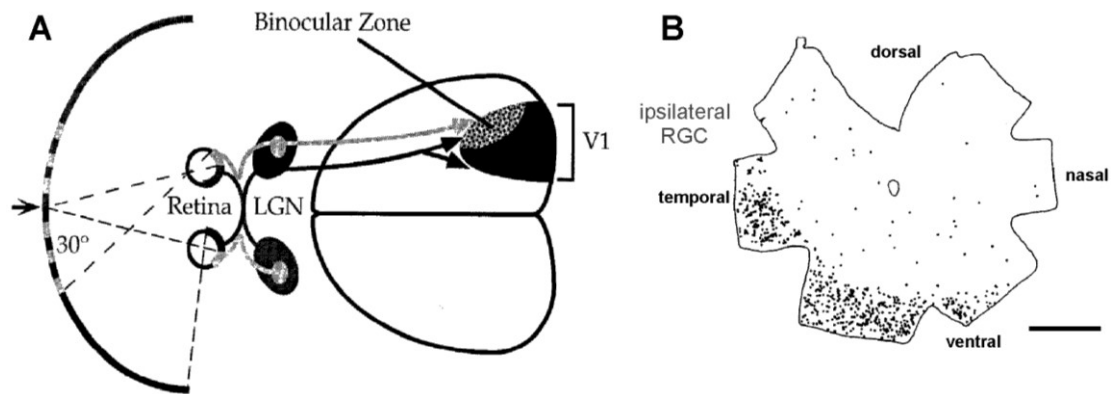


Figura 23. Vía directa de transmisión de la información visual. (A) Esquema de la transmisión de la información ipsi- y contralateral a lo largo de la vía visual directa. La región entre los 0° y 30° azimuth del hemicampo visual nasal de cada retina va a llegar a las regiones binoculares específicas del dLGN y V1 en los dos hemisferios. (B) Dibujo a cámara clara de la retina derecha del ratón donde se ha marcado la localización de las RGC que van a proyectar ipsilateralmente a V1 en la retina temporal-ventral. Ver lista de abreviaturas. Tomado de Gordon y Stryker (1996) y de Dräger y Olsen (1980).

Desde que se describieron las propiedades características de las neuronas de V1, binocularidad y selectividad por una orientación determinada (Hubel y Wiesel 1962) en el gato, se han tratado de identificar en el resto de mamíferos (Hubel y Wiesel 1968; Niell y Stryker 2008). Estas dos propiedades van a reflejar transformaciones del estímulo visual fundamentales propias de los circuitos corticales, aunque centros subcorticales como el tálamo o el SC puedan influir en mayor o menor medida en ellos (Bickford et al. 2015).

Cuando Hubel y Wiesel (1962, 1968) plantearon la cuestión de la selectividad de las neuronas de V1 por una orientación determinada en el gato y el primate, lo explicaron a través del modelo de las células simples y complejas que se van a encontrar distribuidas de forma diferencial en las láminas corticales. Así, las células simples se localizan en las capas corticales que reciben las principales aferencias desde el dLGN (3-4 y 6), donde la información del campo receptivo que transmiten viene segregada en subregiones on/off separadas espacialmente. El alargamiento de cada una de estas subregiones, así como la separación entre regiones del campo receptivo opuestas van a producir estas respuestas selectivas a la orientación en las neuronas de V1. Por el contrario, las células complejas se encuentran principalmente en las láminas 2-3 y 5, y van a recibir proyecciones desde las células simples con la misma preferencia de orientación y permitiendo el solapamiento de sus campos receptivos antagónicos. Estas células también se han observado en ratón pero en menor número y sin una localización tan restringida, sino más entremezcladas entre láminas corticales (Niell y Stryker 2008; Zhao et al. 2013). A pesar de que se piensa que la selectividad por una orientación se lleva a cabo por las células simples de capa 4 en ratones, es posible que debido a sus importantes conexiones en capa 1, como segunda diana principal de las conexiones geniculo-corticales, sea ahí donde se

comunican con las células complejas. Además la lámina cortical 1 es la diana principal de las neuronas selectivas de dirección localizadas en la capa externa del dLGN (Cruz-Martín et al. 2014). También se han estudiado otras propiedades de las neuronas de V1 como su selectividad por determinada velocidad de un estímulo en movimiento (Allen et al. 2016). Por este hecho se ha propuesto que algunas características del campo receptivo de las neuronas de V1 pueden haber sido heredadas del tálamo visual (Rivlin-Etzion et al. 2011; Marshel et al. 2012; Piscopo et al. 2013; Zhao et al. 2013). Debido a esta capacidad integradora de las neuronas de V1 de diversos parámetros de medida del movimiento durante la navegación y su relación directa con áreas corticales encargadas de la propiocepción y la locomoción, se ha observado que la respuesta de V1 afecta directamente modulando el movimiento que se está llevando a cabo (Saleem et al. 2013).

En términos generales, los circuitos corticales implicados en el procesamiento de la información sensorial en V1 están altamente especializados en extraer rasgos simples del estímulo visual como la dirección del movimiento, pero no rasgos de mayor complejidad como el solapamiento de estímulos moviéndose en distintas direcciones ortogonales. Mientras que desde V1 en adelante se han asociado con funciones denominadas “superiores” como la modulación de esta información aferente por funciones cognitivas, como el aprendizaje, relevancia del estímulo o el reconocimiento de patrones a una escala espacial muy precisa para guiar acciones y decisiones (Hughes 1977; Glickfeld et al. 2014; Roth et al. 2016).

5 NÚCLEO TALÁMICO GENICULADO LATERAL DORSAL (dLGN)

Dentro de las vías de procesamiento de la información visual paralelas mencionadas que se originan en la retina, la vía con menor número de estaciones de relevo en su camino a la corteza cerebral es la vía directa o geniculada, en la que va a estar implicada este núcleo talámico. Tras el SC, el dLGN es la estructura subcortical del encéfalo del ratón que va a recibir mayor cantidad de proyecciones retinofugales (35%), seguido de otra de sus dianas talámicas, el complejo LP. Estos tres centros subcorticales constituyen el grueso de las eferencias retinianas en el ratón (Dreher et al 1985, Martin 1986, Morin y Studholme 2014). Durante el desarrollo embrionario, el LGN es el primer núcleo del tálamo dorsal en diferenciarse, consolidándose a partir de células localizadas en la zona marginal dorsolateral de la masa proliferativa que es el tálamo en este

momento del desarrollo (Jones 2007). En roedores se ha descrito que células localizadas en una eversion neuroepitelial situada ventral al rudimento pineal entre los días 14 y 15 del periodo embrionario, van a generar las neuronas del dLGN en un gradiente de externo a interno (lateral-medial) dentro del núcleo (Altman y Bayer 1989; Golding et al. 2014).

El término geniculado fue atribuido por Santorini (1775), que disecó el tracto óptico hasta su entrada en este núcleo talámico, aunque también era conocido como *colliculus nervorum opticum* o *Sehnervenhügel* (Monro 1783; Jones 2007). Los primeros estudios sobre las características macroscópicas y estructura del LGN son los recogidos en el trabajo de Tello (1904). Dentro de los núcleos del tálamo dorsal, es el que presenta mayor grado de variación entre especies incluso dentro del mismo orden, es por ello que en base a su morfología se distinguen el LGN de roedores, carnívoros y primates (Le Gros Clark 1932; Jones 2007). En roedores, el LGN es pequeño, situado dorsolateral y aparece separado del complejo LP por una rama medial del tracto óptico (ot). Tras las primeras ilustraciones de fibras del tracto óptico en ratón por Kolliker (1896), los primeros estudios anatómicos del LGN en ratones jóvenes distinguen tres tipos de neuronas marcadas con impregnación de Golgi: neuronas talámicas de relevo sensorial, interneuronas y fibras procedentes del ot (Figura 24) (Rafols y Valverde 1973).

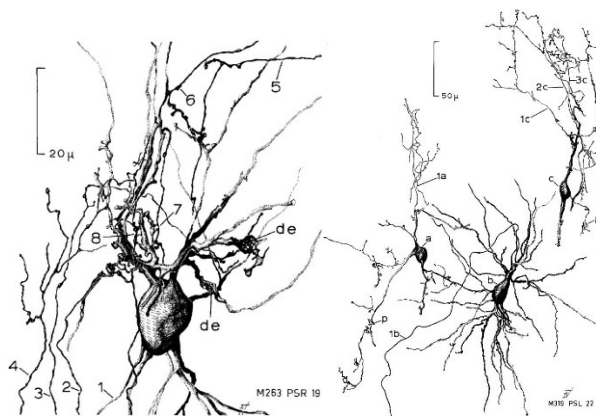


Figura 24. Morfología de las neuronas del dLGN marcadas mediante el método de Golgi en un ratón de cinco días. Se muestran una neurona de proyección TC (izquierda) y tres interneuronas (derecha). Tomado de Rafols y Valverde (1973).

El núcleo geniculado lateral dorsal del tálamo (dLGN) de roedores se sitúa en el extremo dorsal del LGN, y juega un papel clave en el procesamiento de la información visual consciente del entorno, gracias a su posición estratégica permite el flujo de esta información entre el ojo y la corteza visual. Este núcleo talámico no se trata de un centro de relevo pasivo que vehicula señales visuales, sino que constituye un centro de integración de distintos aspectos de las mismas, introduciendo un nivel de complejidad muy importante en su procesamiento (Grubb et al. 2003a). El dLGN es considerado un núcleo talámico de relevo primario que recibe aferencias *driver* de estructuras subcorticales (retina, SC) y las manda hacia cortezas visuales (Sherman y Guillery 2003). Éste es el único núcleo, junto al complejo LP especialmente en niveles

caudales, que comparte con el resto de núcleos talámicos en primates, el hecho de poseer interneuronas GABAérgicas locales aunque en baja proporción (Figura 25, Arcelli et al. 1996; Li et al. 2003; Golding et al. 2014; Bickford 2015). Es por todo ello, que se han estudiado ampliamente las características morfológicas y fisiológicas de este núcleo que representa el inicio del procesamiento visual consciente para la comprensión del funcionamiento del sistema visual en ratones.

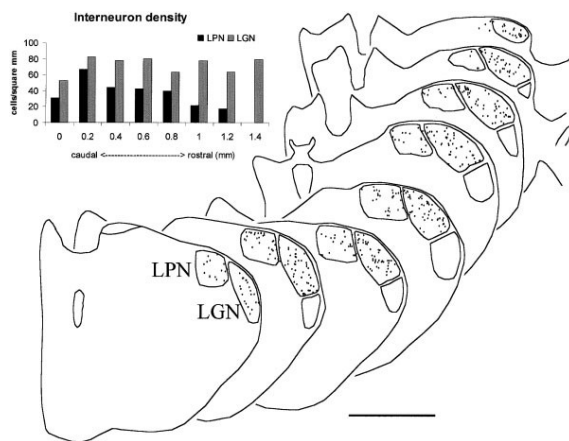


Figura 25. Distribución de las neuronas GABAérgicas en el dLGN y el complejo LP de roedores. Secciones coronales seriadas en una progresión caudo-rostral del tálamo de ratón donde se han ilustrado mediante puntos las neuronas GABAérgicas encontradas en dLGN y el complejo LP (LPN). En la gráfica superior se observa que el dLGN posee mayor cantidad de estas neuronas. Barra de calibración de 1mm. Tomado de Li et al. (2003).

En todas las especies estudiadas se ha observado la existencia de mapas retinotópicos tridimensionales completos en el dLGN, similares al mapa bidimensional en SC, generados por la posición topográfica de cada uno de las RGC que proyectan a estos núcleos y por el grado de convergencia de los mismos sobre la neurona TC postsináptica (Seabrook et al. 2017). Estos mapas se han construido principalmente a partir de estudios anatómicos de degeneración por enucleación o pequeñas lesiones en retina y de depósitos pequeños y focales de distintos trazadores axónicos anterógrados que mapean la organización de las proyecciones de las RGC en toda la extensión de la retina (Montero y Guillery 1968a; Lund et al. 1974; Métin et al. 1983; Grubb et al. 2003b; Pfeifferberger et al. 2006; Xu et al. 2011), y de registros electrofisiológicos de la respuesta de neuronas del dLGN a estímulos presentados en localizaciones concretas del campo visual (Figura 26) (Grubb y Thompson 2003; Piscopo et al. 2013). Debido a la morfología característica de este núcleo y a su tridimensionalidad, la retinotopía en dLGN presenta gran dificultad en su representación tanto en el plano coronal como sagital. Además, se ha observado que el campo visual no está representado de forma uniforme en la retina, ya que la densidad de RGC (especialmente del subtipo α , del que hablaremos después) es mayor en la regiones de la retina con frecuencias de muestreo mayores, lo que se ha observado en la retina ventro-nasal donde se representa el campo visual superior y temporal (Bleckert et al. 2014; Dhande y Huberman 2014c; Baden et al. 2016).

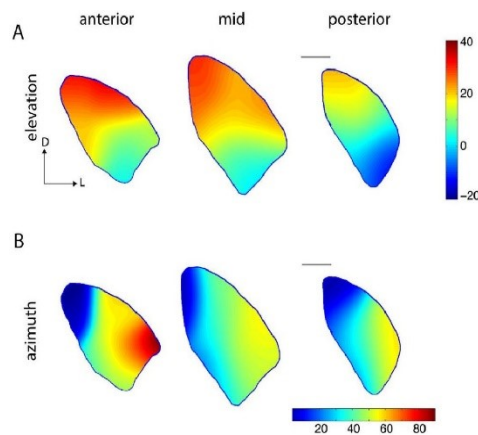


Figura 26. Organización espacial retinotópica de las neuronas TC dentro del dLGN. (A) Mapa de las localizaciones de los campos receptivos medidos mediante estímulos luminosos en las distintas líneas del eje elevación (por encima y por debajo del meridiano horizontal) (A) y azimuth (excentricidad desde el centro de la mirada) (B) del campo visual. El rango de colores representa en A regiones superiores del campo visual (en rojo) hacia regiones inferiores (en azul), mientras que en la figura inferior (B) el rojo se corresponde con regiones de la retina nasal y el azul con la temporal. Ilustrando la progresión desde medial a lateral para azimuth y de dorso-medial a ventro-lateral para elevación. Barra de calibración de 200µm. Tomado de Piscopo et al. (2013).

Las propiedades básicas de campo receptivo en estas neuronas de proyección TC van a ser similares a las RGC, codificando la información de los distintos aspectos del campo visual como movimiento, dirección, color y contraste (Hei et al. 2014). Para ello, los distintos grupos de RGC que codifican distintas características del estímulo visual van a contactar con distintas poblaciones neuronales del dLGN (Seabrook et al. 2017). El ratio de convergencia de RGC sobre dLGN estimado es muy bajo (entre 1-5 RGC sobre 1 neurona del dLGN) tanto en gatos (Cleland et al. 1971) como en ratones (Métin et al. 1983; Chen y Regehr 2000), lo que ayuda a que se preserven las propiedades de campo receptivo en la proyección genículo-cortical, y además, en base a la aferencia *modulatory* desde la corteza se realiza un filtrado de la información (Budisantoso et al. 2012). Hay que considerar que en función del tipo funcional de RGC y la información que vehiculan el grado de convergencia sobre las neuronas TC va a ser variable, como se ha comprobado mediante microscopía electrónica de la sinapsis retinogeniculada (Hammer et al. 2015; Morgan et al. 2016). Aparecen ratios desde un 1-2, a ratios de 1-12, o incluso 1-90 en algunos casos, y también se ha observado variación en este ratio si una misma neurona del dLGN recibe aferencias binoculares (Rompani et al. 2017). Sin embargo, hay que destacar que la proyección retinogeniculada no es punto a punto sino punto a columna, ya que el mosaico de RGC (recogidas en varias subláminas de la retina) es bidimensional, mientras que el dLGN es tridimensional, como ya hemos mencionado. Esta tercera dimensión del dLGN refleja su diversidad funcional. Es más, si lo comparamos con los primates, su dLGN no sólo posee también esta tercera dimensión, sino que además está organizado de forma laminar donde las aferencias procedentes de cada ojo y de los distintos grupos funcionales de RGC aparecen segregadas en las distintas láminas (Nassi y Callaway 2009). Por el contrario, en el dLGN de ratón no se observa una organización laminar tan clara citoarquitectónicamente, a pesar de ello se ha observado que los distintos tipos funcionales de RGC caracterizadas van a proyectar de forma segregada a poblaciones independientes del dLGN, donde se va a continuar la vía neuronal hacia la corteza visual manteniendo esta segregación inicial (Figura 12, Martin 1986; Reese 1988).

Como hemos mencionado en el apartado de la retina de roedores, se han conseguido encontrar marcadores genéticos de varios subtipos de RGC como la calbindina 2 (CB2) para las RGC α , el TRHR para las RGC las selectivas de dirección (DSGC) on/off, o el marcador JAM-B para las DSGC off (Hong y Chen 2011), gracias a lo que se ha comenzado a estudiar la vía específica completa que inician estos tipos de RGC (Huberman, Manu, et al. 2008; Kim et al. 2010; Kay et al. 2011; Rivlin-Etzion et al. 2011; Baden et al. 2016). Tras observar que las RGC α terminan en la región interior del dLGN (*core*) y las DSGC en la lámina externa del núcleo (*shell*) (Cruz-Martín et al. 2014; Bickford et al. 2015), se estudiaron las neuronas TC con las que contactaban para determinar si estas vías paralelas de transmisión de la información se mantenían, y observaron que en la región *core* predominan dos tipos de neuronas de proyección caracterizadas en base a la morfología de su dominio somato-dendrítico y su distribución diferencial dentro del dLGN: tipo X (en regiones monoculares ventrales) y tipo Y (extendidas por todo el *core*), mientras que en la región *shell* se han descrito las neuronas tipo W, que van a recibir no sólo terminales retinofugales sino también coliculares (Figura 27, Krahe et al. 2011).

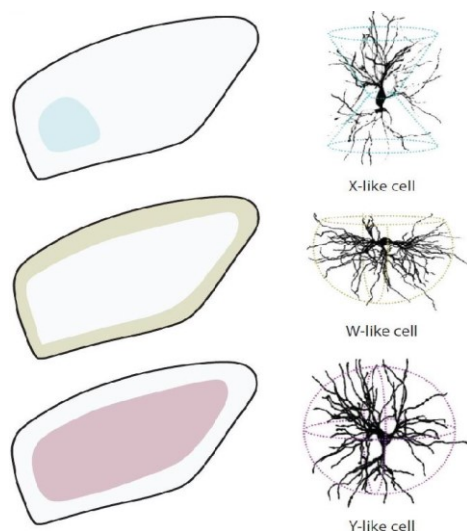


Figura 27. Ejemplos de tipos funcionales de neuronas TC en el dLGN (células tipo X, tipo Y, tipo W). Estos tipos neuronales presentan gran similitud morfológica con los tipos neuronales X, Y, W en el gato, y su distribución regional preferente dentro de una sección coronal modelo este núcleo. A la derecha aparecen tres ejemplos representativos de la morfología somato-dendrítica diferencial de cada uno de estos grupos. Tomado de Krahe et al. (2011) y Seabrook et al. (2017).

Además, estos tres tipos de neuronas TC descritas, que por su morfología y nivel de ubicuidad en su distribución en el dLGN se les ha dado el mismo nombre que a las descritas en el gato (Sherman y Spear 1982), van a proyectar de forma particular a la corteza (Figura 28) (Cruz-Martín et al. 2014; Bickford et al. 2015). Como se ha observado en trabajos utilizando vectores virales selectivos, mientras que las neuronas tipo X e Y situadas en la división *core* del dLGN proyectan principalmente a capas intermedias de V1 y parecen transmitir propiedades del campo receptivo de centro/periferia (Huberman, Feller, et al. 2008; Bickford et al. 2010; Kim et al. 2010; Kay et al. 2011; Piscopo et al. 2013), las neuronas tipo W localizadas en la porción *shell* proyectan principalmente a la capa 1 cortical.

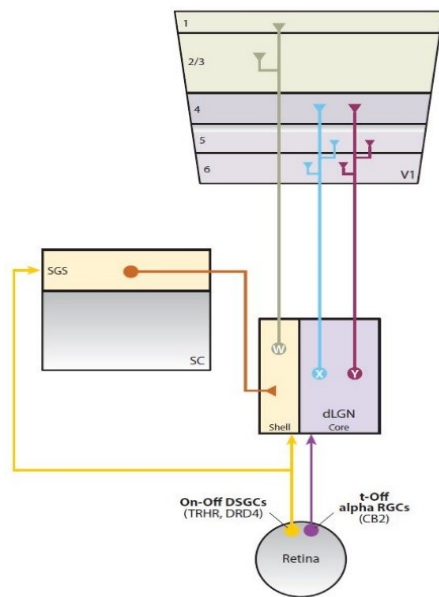


Figura 28. Esquema resumen de las aferencias y eferencias al dLGN segregadas funcionalmente a lo largo de todo el circuito de la vía geniculada. Las neuronas tipo X y tipo Y se localizan en la región *core* de este núcleo talámico, van a recibir las proyecciones de RGC α y van a mandar sus proyecciones TC a capas intermedias del dLGN, actuando como *driver*. Mientras que en la región *shell* del dLGN contiene las neuronas TC tipo W que van a recibir proyecciones de DSGC on/off y del SC, y van a emitir proyecciones a las capas superficiales de V1. Ver lista de abreviaturas. Tomado de Seabrook et al. (2017).

También en cuanto a los mapas oculares en el dLGN, se ha descrito la segregación de aferentes retinianos procedentes de cada ojo en el dLGN. En consecuencia, mientras que los aferentes contralaterales se dispersan cubriendo toda su extensión, los procedentes del ojo ipsilateral quedan reducidos a una pequeña región del núcleo. En esta región terminal, se ha descrito que contactan con neuronas TC ipsilaterales (Grubb et al. 2003a; Zhao et al. 2013), aunque recientemente se ha observado que pueden contactar con aferencias ipsi- y contralaterales simultáneamente (Howarth et al. 2014; Rompani et al. 2017). Las RGC del ojo ipsilateral van a proyectar a una región concreta de la región dorso-medial del dLGN, lo cual se ha observado en multitud de estudios de trazado axónico (Figura 29) (Antonini et al. 1999; Muir-Robinson et al. 2002; Stellwagen y Shatz 2002; Huberman et al. 2003; Jaubert-Miazza et al. 2005; Coleman et al. 2009; Luo et al. 2013). Es por esto, que aunque el dLGN de cada hemisferio recibe aferencias binoculares, la mayor parte del mismo va a recibir únicamente RGC del ojo contralateral, como resultado de carecer de una frontalización ocular completa (Benevento y Miller 1981; Chalupa y Abramson 1988; Antonini et al. 1999; Piscopo et al. 2013; Howarth et al. 2014).

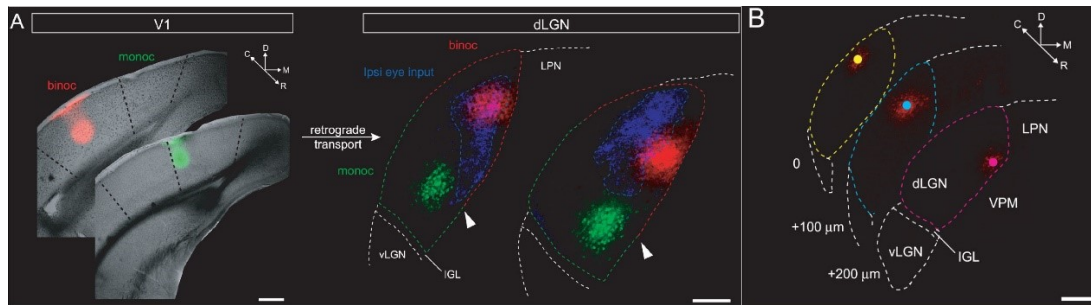


Figura 29. Delimitación de los mapas monocular y binocular en el dLGN. (A) Secciones coronales corticales de V1 del ratón donde se muestran dos depósitos de trazadores retrógrados (CTB) distintos en la región monocular (verde) y binocular (rojo) respectivamente. A continuación, se muestran los somas marcados segregados dentro del dLGN de dos secciones talámicas. También se han representado las aferencias ipsilaterales a la región dorso-medial del dLGN tras una inyección intraocular de trazador retrógrado (azul), situadas en regiones próximas a la región del campo binocular. (B) Secciones coronales seriadas del dLGN donde se muestran los somas marcados tras un depósito retrógrado en la porción binocular de V1. Debido a la morfología del dLGN, el campo binocular va a localizarse en el eje rostro-caudal de posiciones ventro-mediales a dorso-laterales. Barras de calibración de 200µm (A,B). Ver lista de abreviaturas. Tomado de Coleman et al. (2009).

5.1.1 Aferencias

5.1.1.1 Subcorticales

5.1.1.1.1 Retina

Como hemos hablado en apartados anteriores, para el caso del dLGN, su aferencia *driver* procede de la retina (constituye el 30-40% del total de axones retinofugales) y en menor medida del SC, pero también va a recibir aferencias de otras estructuras encefálicas tanto visuales como no visuales (Martin 1986; Sherman 2007; Saalmann y Kastner 2009). Como hemos comentado, existen alrededor de 40 tipos funcionales de RGC, y entre 15 y 20 canales independientes de transmisión de determinados aspectos del estímulo visual que se van a mantener separados a lo largo de la vía directa (Baden et al. 2016). Pero las RGC que nos han permitido reconocer las dos subdivisiones del dLGN del ratón son las DSGC on/off, y por supuesto el descubrimiento de los marcados genéticos como el TRHR que las marcan, que, junto con la distribución de las aferencias tecto-geniculadas, delimitan la división *shell* del dLGN (Figura 30) (Reese 1988; Cruz-Martín et al. 2014; Dhande y Huberman 2014c).

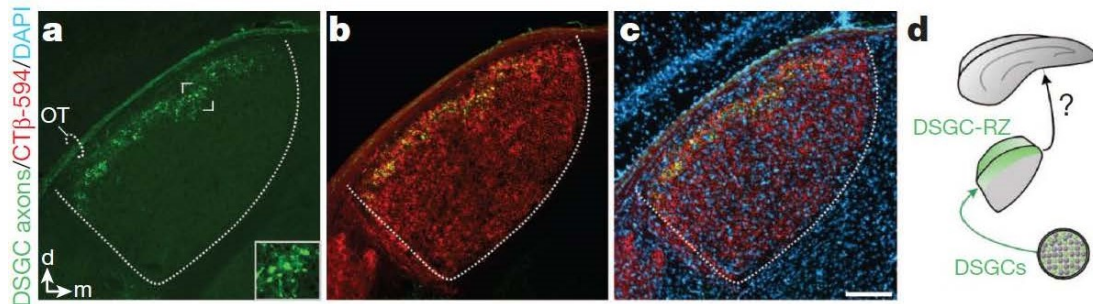


Figura 30. Distribución de los terminales retinogeniculados procedentes de las células ganglionares de tipo DSGC. (a) Microfotografía de una sección coronal del dLGN del ratón donde se han marcado los terminales de las DSGC (verde), limitados a la capa externa del núcleo. Detalle de los botones marcados. (b) Imagen de microscopía confocal donde se ha superpuesto a la imagen anterior las proyecciones retinofugales marcadas mediante una inyección intraocular de CTB (rojo). (c) Imagen confocal donde se ha superpuesto a las anteriores el inmunomarcado de los núcleos celulares con DAPI (49,6-diamidino-2-phenylindole; azul). (d) Esquema resumen de las proyecciones retino-talámicas de las DSGC. Barra de calibración de 125µm. Ver lista de abreviaturas. Tomado de Cruz-Martín et al. (2014).

5.1.1.1.2 *Colículo Superior*

Anteriormente, se ha comentado la relevancia de la proyección topográficamente organizada desde la capa SGS del SC a la región *shell* del dLGN (Figura 31), que se ha conservado en el amplio grupo de mamíferos analizados (Harting et al. 1991). Aunque no se ha comprobado si estas neuronas tecto-geniculadas reciben aferencias directas de la retina (Seabrook et al. 2017). A pesar de esto, debido a que las neuronas localizadas en la división *shell* del núcleo reciben proyecciones de DSGC on/off que a su paso mandan una colateral al SC, junto a las proyecciones del SC que también son de tipo on/off, se ha propuesto que en conjunto pueda tratarse de la vía de procesamiento directo de la dirección movimiento del estímulo visual o del objeto con un contexto en movimiento (Marshel et al. 2012; Piscopo et al. 2013; Scholl et al. 2013; Zhao et al. 2013; Cruz-Martín et al. 2014; Bickford et al. 2015; Roth et al. 2016). Estudios de ablación del SC en ratas muestran que no sólo presentan fallos en la detección u orientación de objetos, sino que también aparece afectada la capacidad de discriminación visual, la cual está directamente relacionada con la vía geniculo-cortical del procesamiento visual, así como una fuerte reducción de la agudeza visual (Cowey et al. 1982).

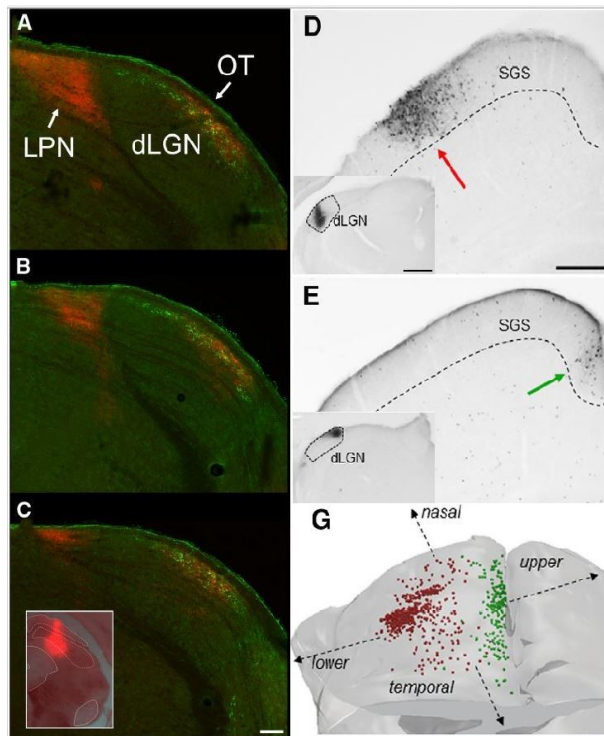


Figura 31. Distribución de las aferencias tecto-talámicas al dLGN en un ratón TRHR transgénico que expresa GFP en sus células DSGC (verde) cuyas proyecciones terminan en la lámina *shell* del dLGN. (A-C) Secciones coronales talámicas seriadas desde niveles caudales a rostrales donde se muestra el marcado de los terminales tecto-talámicos (rojo) tras el depósito de un vector AAV-TdTomato en el SC como aparece en la imagen C, que solapan con las proyecciones de DSGC en el dLGN. (D,E) Secciones coronales de cortes talámicos donde se muestran dos depósitos de CTB en el borde medial (campo visual superior) y lateral (campo visual inferior) de dLGN (esquina inferior izquierda) y los somas retrógradamente marcados en SGS del SC exhibiendo una marcada topografía. (G) Representación tridimensional mostrando la distribución retinotópica de las neuronas tecto-talámicas en SGS. Ver lista de abreviaturas. Barras de calibración de 100µm (A-C) y 250µm (D,E). Tomado de Bickford et al. (2015).

5.1.1.1.3 Otras estructuras subcorticales

Además el dLGN también va a recibir aferencias colinérgicas procedentes del núcleo parabraquial (PBN) en el tronco del encéfalo (Saalman y Kastner 2009). Estas aferencias colinérgicas junto a las CT desde V1 se han propuesto como implicadas en la modulación de la respuesta de las neuronas TC de dLGN, lo que podría proporcionar la base del control atencional de la visión (Wurtz et al. 2011).

5.1.1.2 Corticales

5.1.1.2.1 Corteza Visual

El dLGN recibe aferentes desde la capa 6 cortical que mantienen la organización topográfica (Murphy y Sillito 1996; Murphy et al. 2000). Esta va a constituir su principal aferencia *modulator* desde V1, modificando las propiedades espaciales de sus campos receptivos, alterando el balance de la inhibición centro-periferia (Murphy y Sillito 1987; Sillito y Murphy 1988), y aumenta la sensibilidad para el ajuste de la frecuencia temporal, la longitud del estímulo y su orientación (Cudeiro y Sillito 1996; Marrocco et al. 1996; Sillito et al. 2006; Olsen et al. 2012). Las células situadas en la parte superior de la capa 6 arborizan en el dLGN formando bandas orientadas rostro-caudalmente paralelas a las líneas de proyección de los aferentes retinianos. Mientras que las neuronas de la capa 6 inferior proyectan al LP y emiten una colateral para

inervar el dLGN formando como en el caso estas bandas alargadas características (Bourassa y Deschênes 1995).

5.1.2 Eferencias

5.1.2.1.1 Corteza visual primaria

Tras el procesamiento de la información visual retiniana que se da en el dLGN, como el refinamiento de la sensibilidad al contraste local y temporal de la imagen mediante mecanismos de inhibición lateral gracias al relativo alto porcentaje de interneuronas en comparación con el resto de núcleos talámicos (Arcelli et al. 1996; Li et al. 2003; Wang, Fontanini, et al. 2011), las neuronas glutamatérgicas del dLGN proyectan de forma “específica” a V1. La segregación de estas proyecciones TC en función de las divisiones *shell* y *core* del dLGN hacia capas corticales superficiales e intermedias respectivamente, ya ha sido comentada (Figura 32, Cruz-Martín et al. 2014; Bickford et al. 2015).

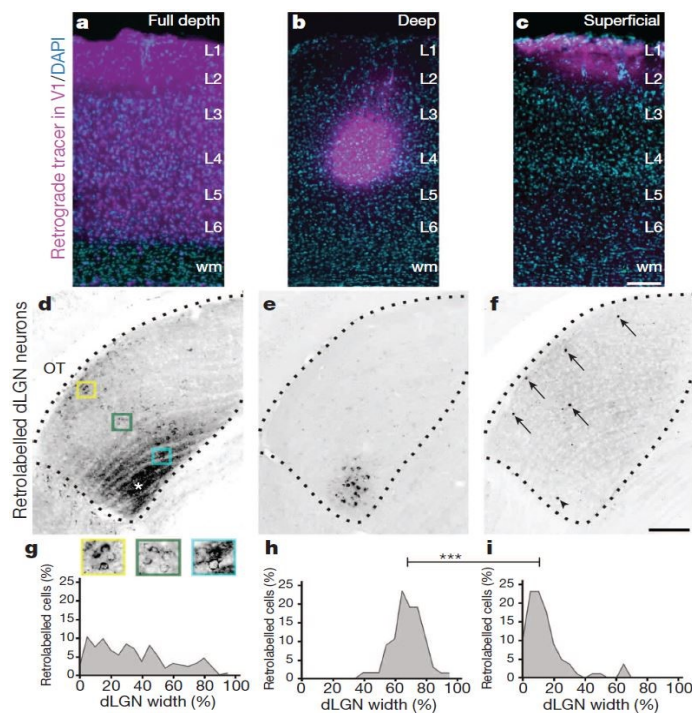


Figura 32. Representación de la topografía y disposición laminar de las proyecciones genículo-corticales. Distribución segregada de estas proyecciones tras el depósito de un trazador axónico de forma columnar afectando a todas las capas corticales (a), un depósito restringido a capas intermedias (b) y un depósito limitado a capa 1 (c). (d-e) Sobre secciones coronales talámicas se observan los somas marcados tras cada uno de los depósitos superiores, junto a una magnificación de los terminales marcados (d). (g-h) Gráficas que indican esta distribución diferencial de los somas que proyectan a capas superficiales o intermedias de V1 a lo largo del eje antero-posterior del dLGN. Barras de calibración de 200µm (a-c) y 100µm (d-e). Tomada de Cruz-Martín et al. (2014).

5.1.2.1.2 Cortezas visuales asociativas

Estas áreas visuales extraestriadas reciben principalmente aferencias TC visuales procedentes del complejo LP (Sanderson et al. 1991), pero se ha descrito una pequeña proyección desde el dLGN a las capas superficiales (capa 1) del área 18a de corteza extraestriada mediante estudios de trazado anterógrado (Dürsteler et al. 1979; Olavarria 1979; Coleman y Clerici 1980; Antonini et al. 1999) que en la actualidad se correspondería con el área LM y

regiones P limítrofes con LM. Esta es una de las razones por las que se ha sugerido que LM podría ser análoga a V2 de primates (Wang y Burkhalter 2007). También estudios de trazado retrógrado afirman la existencia de escasas aferencias geniculadas a capas superficiales de Oc2M, actualmente denominada PM (Ribak y Peters 1975; Hughes 1977), que posteriormente han definido como una proyección moderada (Coleman y Clerici 1980; Perry 1980; Torrealba et al. 1984; Reep et al. 1994).

6 COMPLEJO NUCLEAR LATERAL-POSTERIOR DEL TÁLAMO

Además de la vía geniculada que hemos visto, otras regiones talámicas también van a contribuir en el procesamiento de ciertos aspectos del procesamiento visual a través de la vía extrageniculada. Este término se le otorgó porque inicialmente se consideraba una vía paralela a la vía geniculada para conducir la información de la retina a través del SC hacia cortezas visuales extraestriadas donde pudiera ser comparada con la información procedente de V1 (Schneider 1969; Harting et al. 1973; Baldwin et al. 2011). El complejo talámico lateral posterior o *lateralen hinteren Kern* fue descrito por primera vez en el conejo (Nissl 1913), y más tarde se adoptó el mismo término para roedores (Gurdjian 1927), aunque en muchas ocasiones se ha referido al mismo bajo el nombre de núcleo extrageniculado (Abramson y Chalupa 1988).

Pero recientemente, a medida que se estudia con mayor detalle el patrón de conexiones aferentes y eferentes a este complejo nuclear, al igual que el gran número de funciones en las que parece estar implicado, varios autores han propuesto que debido a esta gran cantidad de analogías con el complejo pulvinar de primates, debería adoptar esta misma denominación en base a la complejidad conectómica multimodal con carácter altamente asociativa que presentan algunos núcleos del complejo LP (Mason y Groos 1981; Tohmi et al. 2014; Roth et al. 2015; Allen et al. 2016; Baldwin et al. 2017; Zhou et al. 2017). Este término, pulvinar (Burdach 1982) se corresponde con un complejo nuclear talámico inicialmente descrito en el gato, pero de especial importancia y tamaño en primates (Isbell 2009). Un hecho clave en la evolución del complejo pulvinar ha sido que su crecimiento extremo en primates se ha producido en paralelo con el crecimiento y diferenciación de la corteza temporal hasta el punto de desplazar ventralmente el dLGN en primates antropoides (Jones 2007). Es cierto que el complejo pulvinar de primates posee una clara división nuclear, y funciones visuales, somatosensoriales y asociativas

evolutivamente más desarrolladas y especializadas que las que se puedan encontrar en roedores, pero a pesar de esto hace ya décadas que especies como conejos, ovejas, cerdos e incluso ardillas entre otras han adoptado este término (Rose 1942; Robson y Hall 1977; Olavarria 1979; Mason y Groos 1980), por lo que en la actualidad se ha dejado de rechazar la posibilidad de encontrar su análogo en ratones. Es más, ya en el trabajo de Mason y Groos (1981) cita: *"May be better referred to as the pulvinar nucleus rather than the lateral posterior nucleus, which in primates does not receive an input from striate cortex or superior colliculus, exemplifying the disparity between cytoarchitectural nomenclature and functional organization"*.

En este trabajo, aunque reconocemos las claras similitudes entre algunas subdivisiones del complejo LP del ratón y del complejo pulvinar de primates en línea con los trabajos más recientes, hemos decidido mantener la nomenclatura tradicional de complejo LP porque ha sido la más utilizada en los estudios previos de esta región talámica. Pero para evitar confusiones, a lo largo de este trabajo no se hará referencia al núcleo LP de primates, sólo a su complejo pulvinar.

A nivel citoarquitectónico, el complejo nuclear LP se trata de una entidad homogénea situada dorsalmente en el tálamo, limitando anterior y medialmente con el núcleo LD, en la pared medial con los núcleos MD y CL, lateralmente con el dLGN, ventralmente con el Po y caudalmente con el APT (Jones 2007). El uso de las técnicas estándar de tinción histo- e inmunohistoquímica como la tinción de Nissl, reacción de la enzima citocromo oxidasa (CyO) o la enzima acetilcolinesterasa (AChE), van a permitir delimitar fácilmente el complejo LP en conjunto por su cito- y mieloarquitectura, y trazar el límite con sus núcleos circundantes (Franklin y Paxinos 2008).

Durante el desarrollo embrionario, se ha descrito en roedores que las neuronas del LP se forman durante los días del periodo embrionario 14 y 15, simultáneamente a las neuronas del LGN, desde una zona del neuroepitelio invertida situada en el espacio entre el rudimento pineal y el neuroepitelio formador del LGN, y cuya región más caudal formará, así mismo, los núcleos pretectales. Estas células neuroepiteliales migrarán para dar lugar al complejo LP posicionándose en una gradiente neurogénico de lateral a medial (Figura 33). Así mismo, la porción lateral del núcleo (LPL) presenta en su desarrollo un gradiente caudo-rostral y dorso-ventral, que no se ha observado en la porción medial del mismo (Altman y Bayer 1989).

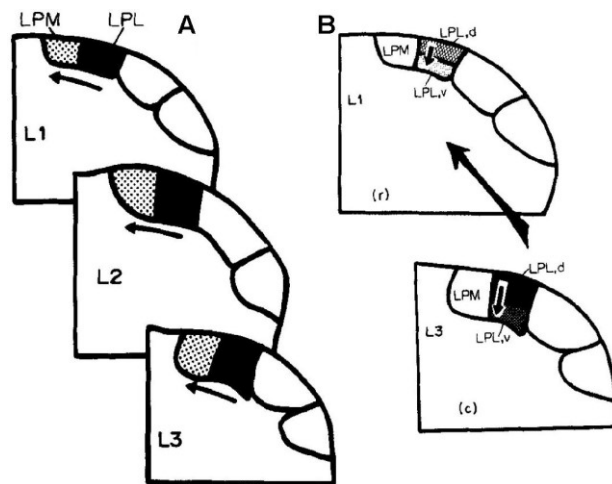


Figura 33. Ontogenia de las neuronas del complejo LP. (A) Desplazamiento durante el desarrollo de las neuronas de las porciones lateral y medial del complejo LP esquematizado en tres secciones coronales rostrocaudales (L1-L3) del tálamo de rata. Los resultados indican un gradiente neurogénico latero-medial muy marcado. (B) En las dos secciones talámicas coronales (rostral-L1 y caudal-L3) aparece dentro de la porción lateral (LPL) además un gradiente de migración caudo-rostral, seguido de otro dorso-ventral hasta alcanzar sus posiciones finales que no se observa en la porción medial del complejo LP. Ver lista de abreviaturas. Tomado de Altman y Bayer (1989).

Las propiedades básicas de respuesta de las neuronas de las distintas divisiones del complejo LP aparecen muy escasamente descritas en la literatura, a pesar de que este complejo nuclear se relaciona con comportamientos guiados visualmente, reacciones *freezing* ante estímulos aversivos y respuestas reflejas a la luz, incluyendo las dependientes del receptor de melanopsina ya que reciben proyecciones de RGC que expresan esta molécula ventralmente en la porción medial del LP (Mrosovsky y Hattar 2003; Johnson, Wu, et al. 2010; Nosedá et al. 2011; Delwig et al. 2012; Allen et al. 2016). Se ha observado que las neuronas del LP poseen grandes campos receptivos circulares. En base a sus perfiles de respuesta temporal se han distinguido tres tipos de células (transitoria, sostenida o con retraso; estos dos últimos tipos muy relacionadas con las aferencias retinianas melanopsina positivas), con una distribución diferencial dentro del complejo LP, cuyas diferencias en este aspecto pueden ser parcialmente explicadas por las aferencias procedentes de distintos tipos de fotorreceptores que reciben y con distintos papeles funcionales (Allen et al. 2016). Al analizar las propiedades de las células de tipo transitorio se han observado campos receptivos centro-on (en el 80% de las células registradas) y en menor medida de centro-off. No se han encontrado neuronas que respondan a estímulos visuales ipsilaterales, y a pesar de que en muchos otros mamíferos se trata de un rasgo común, en ratones sólo alrededor de un 25% de las células registradas respondían a estímulos binoculares, y todas ellas estaban situadas en la porción lateral del complejo LP (Allen et al. 2016). En cuanto a su organización retinotópica (Figura 34), especialmente en regiones más laterales de este complejo nuclear aparece una organización específica en el eje vertical del campo visual (grados de elevación), pero en el horizontal (azimut) no parece muy precisa; aunque debido a la heterogeneidad de los resultados sugieren la posibilidad de que las subpoblaciones neuronales dentro del LP presenten distintas organizaciones topográficas (Mason y Groos 1980; Allen et al. 2016).

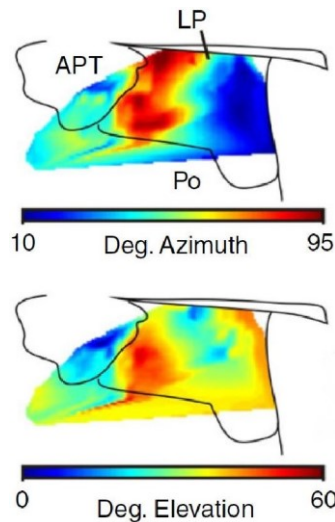


Figura 34. Organización retinotópica de las neuronas del complejo LP en ratones. Sobre las dos representaciones esquemáticas del complejo LP, correspondientes con niveles de LPL y LPMR, en una sección coronal se observa la media de las posiciones de los campos receptivos en los distintos planos de elevación y azimuth para las neuronas registradas en el LP, revelando una difusa organización retinotópica. Ver lista de abreviaturas. Tomado de Allen et al. (2016).

6.1.1 Divisiones del complejo LP

Las subdivisiones dentro del complejo LP en roedores son muy difíciles de delimitar y en la actualidad sigue existiendo gran controversia, especialmente en roedores nocturnos ya que a nivel citoarquitectónico no se observan cambios en el tamaño o morfología de sus somas o en su mieloarquitectura. Mediante el uso de diversas tinciones histoquímicas e inmunohistoquímicas, como la calretinina (CR) se observa una mayor inmunoreactividad en la porción medial del núcleo en rata, lo que en niveles caudales podría ayudar en la delimitación del LP caudomedial (LPMC) (Figura 35) (Résibois y Rogers 1992; Winsky et al. 1992; Arai et al. 1994). Mientras que la calbindina (CB) marca igualmente la porción medial, pero con mayor intensidad niveles rostrales (Arai et al. 1994). Estas neuronas CR suelen tratarse de interneuronas inhibitorias, por lo que son muy escasas en los núcleos del tálamo de roedores (Résibois y Rogers 1992; Zhou et al. 2017). El marcado producido por la reacción de CyO y el inmunomarcado de AChE son más intensos en la porción rostromedial del LP (LPMR) en muchos mamíferos (Baldwin et al. 2013).

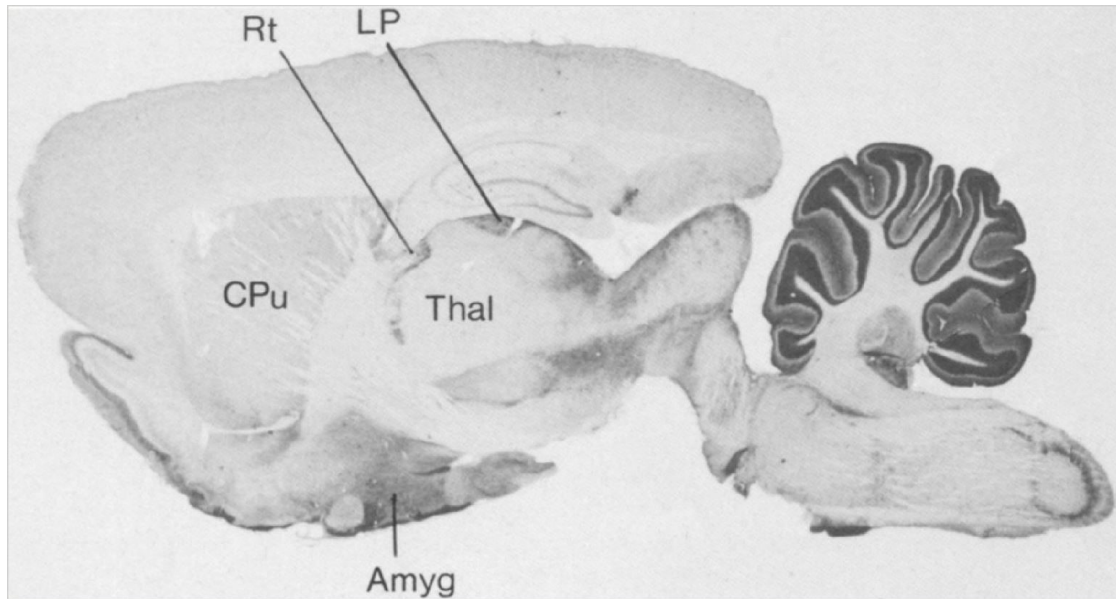


Figura 35. Sección parasagital del encéfalo de rata donde se muestran las regiones que presentan inmunoreactividad frente a calretinina (CR). Dentro del complejo talámico el grupo anterior y la región caudal del complejo LP son las que presentan mayor marcado. El TRN, el estriado dorsal (Str/CPu) y la amígdala van a ser las estructuras prosencefálicas con mayor inmunoreactividad ante esta proteína ligadora de calcio. Ver lista de abreviaturas. Modificado de Résibois y Rogers (1992).

Otra molécula cuyo patrón de distribución ha sido útil en estudios del tálamo visual en galago (Baldwin et al. 2013), en la tupaya (Balaram et al. 2015) y en la ardilla (Baldwin et al. 2011) es el transportador vesicular de glutamato 2 (vGluT2), que se utiliza como marcador de las proyecciones subcorticales al tálamo dorsal, marcando con distinta intensidad los núcleos que reciben en mayor (como el LP caudal) o menor medida (LPMR) este tipo de aferentes (Figura 36, Baldwin et al. 2013). Esto es debido a que el complejo nuclear LP/pulvinar ha sido dividido en muchos mamíferos en base al origen específico de estas aferencias subcorticales, principalmente la retina y el SC, y corticales (Mason y Groos 1981; Takahashi 1985). Siendo común en muchos mamíferos la existencia de una región del pulvinar que recibe proyecciones del SC y proyecta a regiones visuales laterales y otras áreas temporales (Lyon et al. 2003; Chomsung et al. 2010).

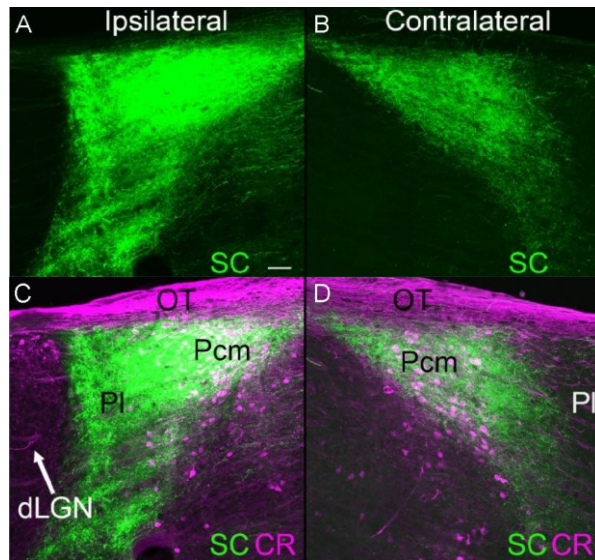


Figura 36. Distribución de los terminales procedentes del SC que llegan de forma ipsilateral al LPL y bilateral al LPMC sobre secciones coronales del complejo LP del ratón (A, B). Para facilitar la delimitación del LPMC se ha realizado una tinción inmunofluorescente frente a calretinina (morado) y se observa mediante microscopía confocal el solapamiento de ambas secciones (C, D) para comprobar que la CR sólo marca el LPMC. Barra de calibración 50µm. Ver lista de abreviaturas. Tomado de Zhou et al. (2017).

Funcionalmente, también se ha dividido el complejo LP (en roedores) o pulvinar (en primates) en dos porciones, una encargada del control de acciones guiadas visualmente, así como localización en el espacio, incluso memoria espacial, y otra porción lateral relacionada en mayor medida con la discriminación directa de objetos (Kaas y Lyon 2008; Arcaro et al. 2015). Pero en el ratón hasta el momento no hay un convenio establecido en cuanto a los límites citoarquitectónicos o funcionales de estos subnúcleos, e incluso algunos trabajos recientes niegan la existencia de una parcelación clara en el LP (Allen et al. 2016). Es por esto que para lograr una delimitación precisa de estos subnúcleos se necesita complementarlo con el estudio sistemático de sus conexiones aferentes y eferentes, como hemos mencionado con anterioridad.

Los primeros trabajos en los que se plantea una subdivisión clara en base a sus aferencias coliculares y su función del LP de ardillas (Robson y Hall 1977; Baldwin et al. 2011) proponen cuatro subdivisiones por analogía al complejo pulvinar de tupayas y primates. En tupayas, una porción caudal que presenta una clara inmunoreactividad para la enzima CyO, la enzima AChE y vGluT2, recibe aferencias bilaterales recíprocas ipsilateralmente del SC y con una posible organización retinotópica. Una porción rostrolateral subdividida a su vez en región medial y lateral, cada una recibiendo un patrón retinotópico distinto de aferencias ipsilaterales del SC. Y una porción medial que no recibe aferencias del SC (Robson y Hall 1977; Baldwin et al. 2011). En primates, el complejo pulvinar se divide en los núcleos lateral e inferior que reciben conexiones subcorticales topográficamente organizadas de la retina y el SC, así como de cortezas visuales primaria y asociativas; el núcleo pulvinar anterior que recibe proyecciones de la corteza somatosensorial; y el pulvinar medial que va a mantener conexiones con áreas corticales multisensoriales y asociativas (Dick et al. 1991; Stepniewska 2003; Kaas y Lyon 2007).

En el complejo LP del hámster (Crain y Hall 1980; Ling et al. 1997) se han distinguido tres subdivisiones en base a su citoarquitectura y patrón de aferencias: un núcleo caudal que recibe aferencias bilaterales difusas del SC, un núcleo rostrolateral que también recibe aferencias de SC pero más ordenadas y un núcleo rostromedial que no recibe aferencias coliculares. Pero sin considerar las posibles diferencias en las principales dianas de las proyecciones eferentes de cada subdivisión, debido a carencia de este tipo de trabajos hodológicos.

Estudios en rata, de forma muy similar al ratón, han dividido al complejo LP en cuatro porciones (Takahashi 1985) y, más recientemente, en tres núcleos denominados en base a su posición anatómica como núcleo lateral del LP (LPL), núcleo caudo-medial del LP (LPMC) y núcleo rostromedial del LP (LPMR) (Kamishina et al. 2009; Masterson et al. 2009). Distinguiendo dentro del LPL, en muchos casos, una porción rostral que recibe principalmente aferencias retinianas y corticales (desde áreas visuales estriadas y extraestriadas), y una parte más caudal que recibe aferencias bilaterales del SC (Nakamura et al. 2015). Esta nomenclatura se ha asumido también en estudios recientes en ratón (Figura 37) (Zhou et al. 2017), pero en nuestro trabajo lo denominaremos núcleo LPL sin distinguir subdivisiones.

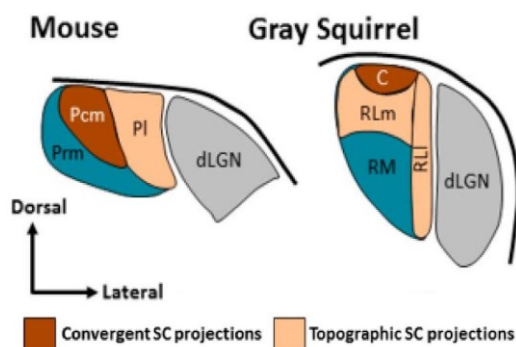


Figura 37. Esquemas de la organización nuclear del complejo LP en el ratón y la ardilla, que en la figura han denominado pulvinar (P). En estas representaciones se indica la división de del LP en base a su patrón de aferencias desde el SC. Ya que se ha observado que proyecta a toda la porción caudal de LP, donde se encuentran los núcleos LPMC (Pcm) y parte del LPL (PI), pero de distinta forma. El LPL recibe una proyección ipsilateral topográficamente organizada (color naranja), mientras que la del LPMC es bilateral con una organización más difusa (color marrón). En color azul aparecen las regiones que no reciben proyecciones del SC. Ver lista de abreviaturas. Tomado de Zhou et al. (2017).

6.1.2 Aferencias

6.1.2.1 Subcorticales

6.1.2.1.1 Colículo superior

Los distintos núcleos del LP van a recibir en diferente proporción aferencias *driver* del SC que conservan el orden retinotópico en mayor o menor medida en roedores y primates (Baldwin et al. 2011; Li et al. 2013).

Como inicialmente se había comprobado mediante la inyección de aminoácidos tritiados, las capas superficiales del colículo superior proyectan conservando la retinotopía al LP caudal en la rata (Langer y Lund 1974), LP inferior en gatos (Graham 1977) y pulvinar inferior en primates (Harting et al. 1980; Bender 1981; Ungerleider et al. 1983; Jones 2007). Estudios en hámster han demostrado que la proyección ipsilateral del SC al LP está topográficamente organizada, mientras que en la contralateral no es así (Crain y Hall 1980). En ratas, estudios de lesión parcial o total del SC muestran importantes daños en la capacidad de percepción y orientación de objetos en el espacio, especialmente en movimiento debido a que, a nivel hodológico, van a verse alteradas las conexiones entre áreas visuales asociativas que estaban conectadas a las distintas subdivisiones del complejo LP (Cowey et al. 1982; Tohmi et al. 2014; Allen et al. 2016), ya que además está relacionado con la iniciación de movimientos sacádicos (Sparks et al. 2000). Los primeros estudios de trazado retrógrado con HRP en el LP (Donnelly et al. 1983), muestran que aproximadamente el 80% de las aferencias del SC proceden del estrato óptico y el 20% restante del estrato gris superficial (Figura 38) (Sugita et al. 1983; Chomsung et al. 2008; Gale y Murphy 2014), presentando el 65% del total inmunoreactividad frente a CB (Lane et al. 1993). Además estudios electrofisiológicos han detectado una respuesta preferente de estas neuronas receptoras de las proyecciones de las capas superficiales SC por estímulos visuales en movimiento mostrando sensibilidad por direcciones específicas (Mason y Groos 1981).

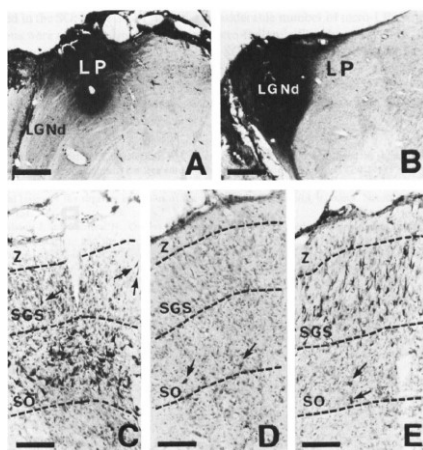


Figura 38. Marcado retrógrado de las proyecciones del SC al dLGN y al complejo LP de roedor. (A, B) Microfotografías de secciones coronales del tálamo de rata donde se muestra una inyección del trazador retrógrado WGA-HRP en el LP (A) y el dLGN (B). (C, D, E) Secciones coronales del SC donde aparecen marcadas las neuronas que van a constituir la vía tecto-LP desde el estrato óptico principalmente y en menor medida desde el estrato gris superficial (C, D) y las neuronas marcadas en el estrato gris superficial tras la inyección en dLGN que formarán la vía tecto-geniculada (E). Barras de calibración de 500µm (A, B) y 100µm (C-E) Tomado de Sugita et al. (1993).

Estudios posteriores combinando marcado anterógrado de los axones del SC y trazadores retrógrados fluorescentes inyectados en regiones mediales y laterales de LP en el gato, mostraron que existe una segregación topográfica muy precisa de las proyecciones de dos grupos celulares en el estrato gris superficial y en el estrato óptico del SC (Abramson y Chalupa 1988; Linke et al. 1999). Un poco más tarde se describe en ratas la vía tecto-LPL ipsilateral y topográficamente organizada, que recientemente se ha observado en el ratón (Lane et al. 1993;

Zhou et al. 2017). Regiones mediales del SC proyectan al LPL dorsal y regiones laterales del SC al LPL ventral, lo cual considerando el mapa retinotópico del SC, implicaría que el campo visual superior está representado en el LPL dorsal y campo visual inferior en el LPL ventral (Figura 39) (Donnelly et al. 1983; Chomsung et al. 2008; Day-Brown et al. 2010a).

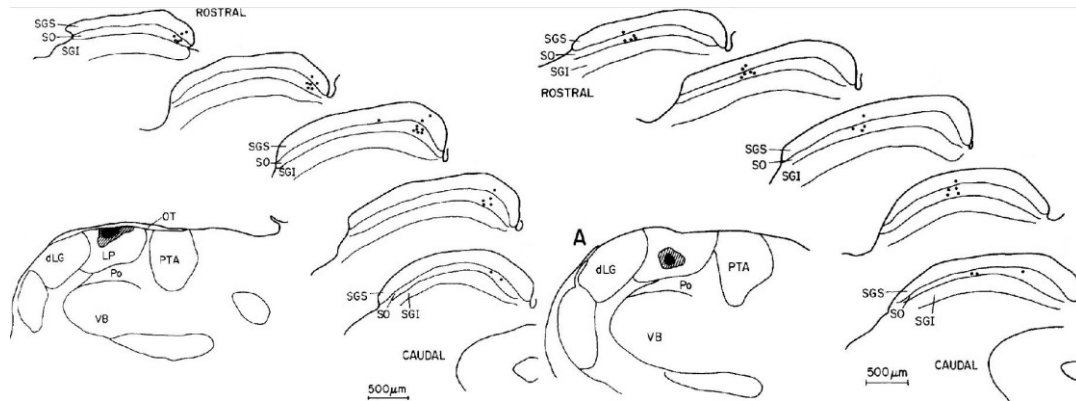


Figura 39. Distribución topográfica de las conexiones del SC con el complejo LP marcadas mediante trazadores retrógrados. Dibujos a cámara clara de secciones coronales del SC de ratona en una progresión rostro-caudal sobre las que se han marcado con puntos las neuronas retrógradamente marcadas tras las inyecciones de HRP en el LPL dorsal (izquierda) y el LPL ventral (derecha). Tomada de Donnelly et al. (1983).

Por otro lado, estas fibras procedentes principalmente del estrato óptico y en menor densidad de la región ventral del estrato gris superficial van a terminar extensa y densamente de forma bilateral con una organización topográfica difusa en regiones caudomediales del LP (LPMC) como se ha observado mediante trazado anterógrado con BDA (Figura 40) (Mason y Groos 1981; Donnelly et al. 1983; Harting y Huerta 1983; Sugita et al. 1983; Mooney, Nikolettseas, Hess, et al. 1988; Miguel-Hidalgo et al. 1989; Lane et al. 1993; Ling et al. 1997; Shi y Davis 2001; Baldwin et al. 2011), así como mediante el marcado con diversos vectores virales (Figura 41) (Bickford et al. 2015; Zhou et al. 2017).

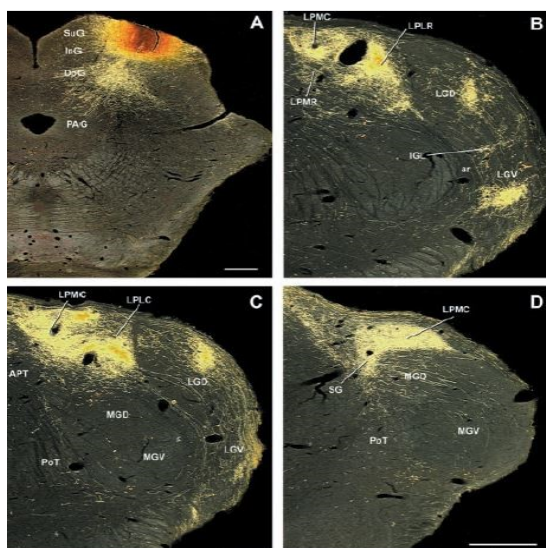


Figura 40. Distribución de terminales tecto-talámicas marcadas tras un depósito de BDA en las capas superficiales del SC. Microfotografías en campo oscuro de secciones coronales del SC (A) y del tálamo caudal (B, C, D). Barra de calibración de 200 μm. Ver lista de abreviaturas. Tomado de Shi y Davis (2001).

Estudios de la morfología precisa de estos terminales muestran que comparten las características de los terminales axónicos tipo 1 (corticales y subcorticales) descritos por Guillery (1995), por lo que en base a sus rasgos morfo-funcionales constituirían una de las aferencias *driver* a la región caudal del complejo LP (Ling et al. 1997). Las neuronas TC diana de las aferencias tecto-talámicas se les ha atribuido un papel en la percepción de patrones de movimiento en gatos (Merabet et al. 1998; Casanova et al. 2001; Lomber 2002). Y en roedores se observa, no sólo una mayor variedad morfológica en las células del SC al LP en comparación con dLGN (Mooney et al. 1984), sino que además las que proyectan al LP muestran campos receptivos sensibles a los estímulos visuales en movimiento a diferencia de las que proyectan a dLGN que sólo responden a estímulos visuales inmóviles (Mooney et al. 1988). En casos de ablación del SC o enucleación se intuye la existencia de una competitividad por el espacio entre las proyecciones CT (y en cierta medida del tracto óptico) y las aferentes del SC en la porción caudal del complejo LP (Crain y Hall 1980; Ling et al. 1997; Li et al. 2003; Tohmi et al. 2014).

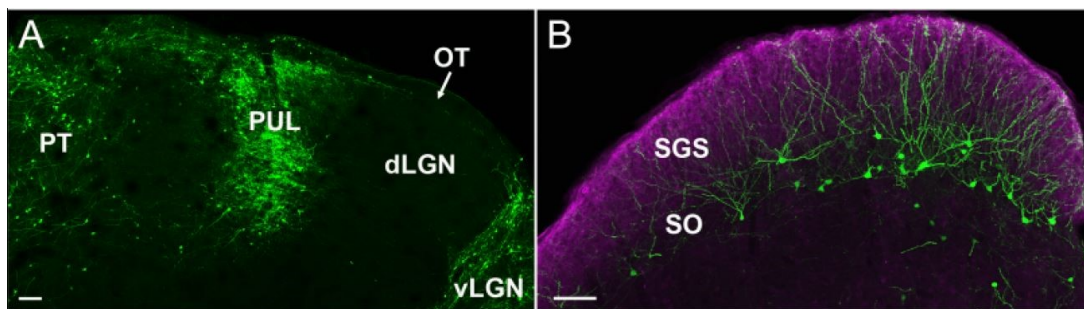


Figura 41. Marcado de las conexiones tecto-talámicas desde las capas superficiales del SC marcadas mediante vectores virales. (A, B) Microfotografías de una sección coronal del tálamo visual (A) y del SC contralateral (B) del ratón, donde se observa la inyección en el LPMC, que ha sido considerado por los autores como pulvinar (pul) (A) de un vector viral retrógrado que va a marcar en verde las neuronas del estrato óptico y la región inferior del estrato gris superficial del SC (B). Barras de calibración de 100µm (A,B). Ver lista de abreviaturas. Tomado de Zhou et al. (2017).

Esta vía colicular también se ha relacionado con la capacidad de individuos con lesiones extensas en V1 de usar señales visuales para guiar sus movimientos sin ser conscientes de esta información, este fenómeno se ha denominado “visión ciega” (Alexander y Cowey 2010; Day-Brown et al. 2010b). Y con la capacidad de producir respuestas motoras ante imágenes que suscitan miedo en el individuo antes de su percepción consciente, posiblemente, mediante conexiones directas entre las regiones receptoras de fibras del SC y la amígdala en el complejo pulvinar, lo que se ha denominado “miedo subliminal” (Liddell et al. 2005; Tamietto et al. 2010, 2012; Abivardi y Bach 2017).

6.1.2.1.2 *Retina*

Múltiples estudios han demostrado la existencia de una pequeña aferencia directamente de la retina al complejo LP en roedores, especialmente densa en su porción rostro-lateral (Yamadori 1977; Perry y Cowey 1982; Ahmed y Rahi 1985; Ling et al. 1997; Morin y Studholme 2014). En primates se ha observado, mediante estudios de con depósitos intraoculares de trazadores como HRP, esta misma proyección retinofugal que termina principalmente en la parte medial del pulvinar inferior bilateralmente (O'Brien et al. 2001) y de forma muy débil en la región dorsal del pulvinar medial contralateralmente (Itaya y van Hoesen 1982). Estudios actuales de inyección intraocular de CTB en el ratón (Morin y Studholme 2014), ponen de manifiesto que las principales dianas de las proyecciones retinofugales tras el SC y el dLGN, son a la región rostral del LPL y, de forma escasa, el LPMR (Figura 42). Estas proyecciones al LP son principalmente contralaterales aunque en baja proporción se observan también terminales bilaterales en el LPL, pero en ningún caso regiones únicamente ipsilaterales (Ahmed y Rahi 1985; Allen et al. 2016). Dentro de las RGC que proyectan desde la retina del ratón se hallan neuronas melanopsina positivas, las cuales han sido relacionadas con respuestas motoras reflejas a cambios en la intensidad lumínica, y son de las pocas RGC estudiadas que integran la información visual ipsi- y contralateral ya que proyectan bilateralmente a regiones del LP organizadas retinotópicamente (Allen et al. 2016).

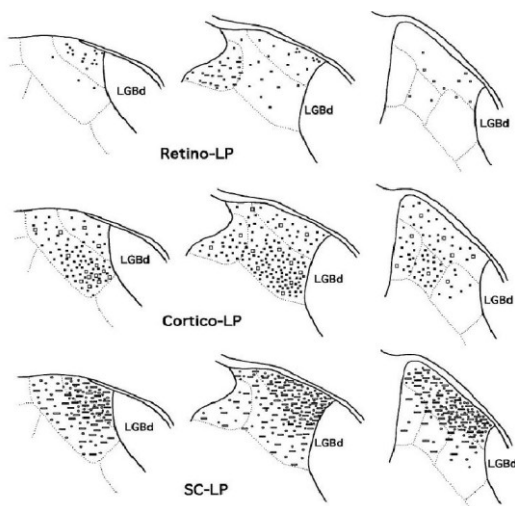


Figura 42. Densidad y distribución de los tres principales orígenes de proyecciones aferentes al complejo LP: retina, corteza visual y SC. Se representan sobre esquemas de secciones coronales del tálamo de hámster. Ver lista de abreviaturas. Tomado de Ling et al. (1997).

6.1.2.1.3 *Otros núcleos del tronco del encéfalo*

A diferencia de otros roedores, la rata y el ratón no reciben aferencias de núcleos pretectales, ya que éstas van a llegar al núcleo LD (Robertson 1983).

Pero poseen otras aferencias subcorticales minoritarias procedentes de la sustancia nigra pars reticulata (SNr) (Takada 1992) y el núcleo pedúnculo pontino (PPT) (Kobayashi et al. 2007). Estas aferencias indican que el complejo LP forma parte de la transmisión y modulación de la información visuomotora hacia estructuras subcorticales como el Str y el núcleo lateral de la amígdala (LA), y la corteza cerebral (Bourassa y Deschênes 1995; Linke et al. 1999; McHaffie et al. 2005). En rata se ha observado mediante doble marcado anterógrado con BDA y retrógrado con CTB que las proyecciones ipsilaterales desde PPT y las neuronas talámicas de proyección al Str localizadas en la región ventral del complejo LP solapan en gran medida, e incluso se ha estudiado este contacto sináptico con microscopía electrónica (Kobayashi et al. 2007).

Por otro lado, las regiones del LP que reciben aferencias desde SNr y proyectan al Str caudal se han identificado como un nodo de la red de integración sensimotora hipocampo (HC)-corteza retrosplenial (RSD/RSG)-LP (Kordys et al. 2017). Varios estudios sobre el papel del complejo LP y otras estructuras subcorticales como el SC modulando el circuito entre la corteza y los ganglios basales en la rata utilizando combinaciones de trazadores anterógrados y retrógrados (McHaffie et al. 2005; Coizet et al. 2007), afirman que el complejo LP gracias a sus aferencias desde el SC, desde la SNr o desde PPT (que a su vez recibe aferencias desde SNr) van a transmitir esta información visuomotora de forma topográficamente organizada a regiones laterales, dorsales y caudales de la periferia del Str, modificando la información de las vías estriato-nigral y estriato-cortical (Kobayashi et al. 2007).

6.1.2.2 Corticales

6.1.2.2.1 *Corteza visual*

Las aferencias corticotalámicas (CT), que proceden de capas 5 y 6 en cortezas extraestriadas y de capa 5 y 6 inferior en V1 (Mason y Groos 1981; Schober 1981; Bourassa y Deschênes 1995; Li et al. 2003), van a proyectar manteniendo la retinotopía de forma diferencial a determinados subnúcleos del complejo LP (Perry 1980; Mason y Groos 1981; Schober 1981; Ling et al. 1997). Las neuronas en la parte inferior de la capa 6 de V1 van a proyectar al TRN y al LPL únicamente. Mientras las neuronas de capa 5 no proyectan al TRN, pero sí emiten varias ramas que entran en el tálamo para inervar el LP en su extensión, el vLGN y el LD, además algunas ramas van a continuar su camino caudalmente para alcanzar los núcleos pretectales y las capas superficiales del SC (Bourassa y Deschênes 1995). También se han descrito proyecciones desde la capa 6 de

cortezas temporales (TeA) al polo caudal del complejo LP en ratas (Figura 43) (Mason y Groos 1981).

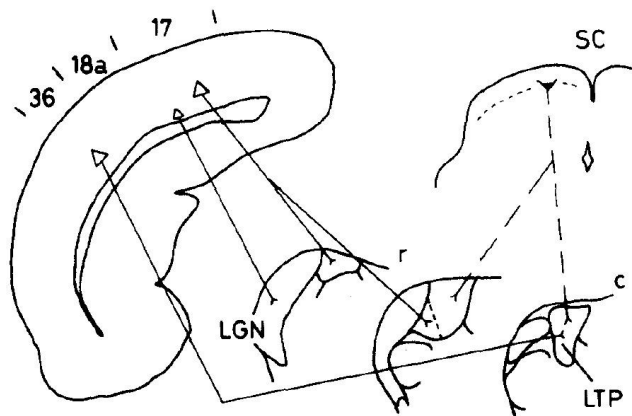


Figura 43. Esquema resumen de algunas de las principales aferencias al complejo LP, desde las capas superficiales del SC y desde cortezas visuales primaria, asociativa y temporales (área 36). También está representada la proyección *modulatory* desde la capa 6 de V1 al dLGN. Ver lista de abreviaturas. Tomado de Mason y Groos (1981).

Estudios de marcado anterógrado con BDA en toda la extensión laminar de V1, muestran que según la clasificación propuesta por Sherman y Guillery (1998), llegan a dLGN y a todo el complejo LP axones tipo 2 o *modulator* que se caracterizan por ser axones muy finos que inervan las dendritas distales de las neuronas TC, presentan terminales pequeños en forma de palillos de tambor y no contactar de forma postsináptica con neuronas GABAérgicas (Figura 44). Mientras que desde V1 también se van a originar axones CT tipo 1 o *driver*, que únicamente terminan en regiones rostromediales (LPMR) y laterales del complejo LP (LPL), y se caracterizan por ser axones de mayor calibre que presentan gruesos terminales formando grupos o glomérulos en ocasiones con gran cantidad de células de glía a su alrededor, y tampoco van a contactar con neuronas GABAérgicas en ningún caso; este tipo de aferencia *driver* desde la corteza permite clasificar a estos núcleos del complejo LP, especialmente el LPMR, en núcleos asociativos o HO (Abramson y Chalupa 1985; Bourassa y Deschênes 1995; Guillery et al. 2001; Sherman y Guillery 2011). Por el contrario, los axones aferentes retinogeniculados a pesar de presentar características similares a los axones CT tipo 1 (Sherman y Guillery 2011), van a contactar en un 26% con neuronas GABAérgicas del dLGN, como se ha determinado mediante microscopía electrónica en la rata (Li et al. 2003). El complejo LP en roedores va a recibir sus principales aferencias *driver*, en función del núcleo considerado, desde el SC, la retina y la capa 5 cortical de las áreas corticales V1 y LM, mientras que sus proyecciones *modulator* proceden de la capa 6 cortical de múltiples cortezas visuales estriada y extraestriadas, como se propuso inicialmente para carnívoros (Guillery et al. 2001; Kaas y Lyon 2007; Sherman y Guillery 2011; Tohmi et al. 2014).

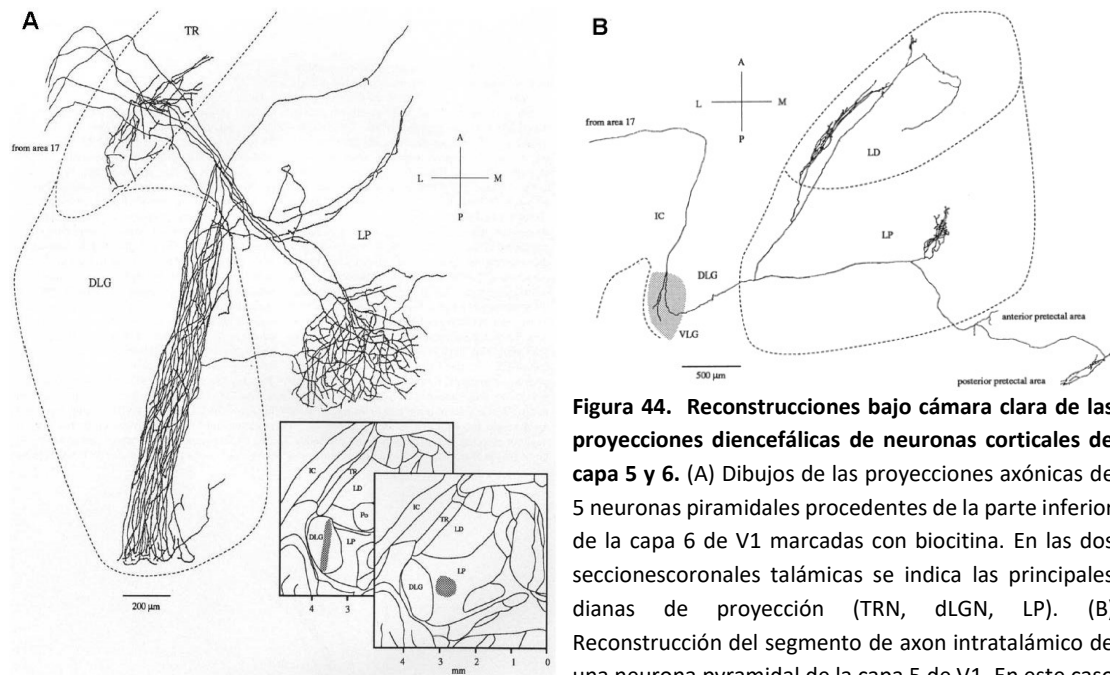


Figura 44. Reconstrucciones bajo cámara clara de las proyecciones diencefálicas de neuronas corticales de capa 5 y 6. (A) Dibujos de las proyecciones axónicas de 5 neuronas piramidales procedentes de la parte inferior de la capa 6 de V1 marcadas con biocitina. En las dos seccionescoronaes talámicas se indica las principales dianas de proyección (TRN, dLGN, LP). (B) Reconstrucción del segmento de axon intratalámico de una neurona pyramidal de la capa 5 de V1. En este caso sus proyecciones axónicas van a terminar en la porción ventral del LGN (vLGN), LP, LD y APT. Ver lista de abreviaturas. Tomado de Bourassa y Deschênes (1995).

6.1.3 Eferencias

6.1.3.1 Corticales

6.1.3.1.1 Corteza estriada

El complejo nuclear LP en muchos roedores, como se ha descrito en ratas, posee conexiones con áreas corticales estriadas, extraestriadas y asociativas de los lóbulos temporal, parietal y frontal (Sukekawa 1988; Reep et al. 1994; Tohmi et al. 2014). Esto sugiere que podría estar participando en integración multimodal para la producción de comportamientos complejos (Conte et al. 2008). Es por todo ello que las eferencias del complejo LP, en función del núcleo estudiado van a presentar gran variabilidad, en algunos casos proyectando a áreas unimodales de forma topográfica, y en otros casos presentando una alta complejidad en su arquitectura TC alcanzando áreas corticales multimodales muy alejadas entre sí (Chandler et al. 1992; Kamishina et al. 2008, 2009).

El complejo LP va a proyectar ipsilateralmente a V1, de forma recíproca, donde su patrón laminar es mayoritariamente, considerando todos los núcleos que forman el LP, a capa 1 aunque a veces puede ramificar en capa 5 (Robson y Hall 1977; Dürsteler et al. 1979; Olavarria 1979; Frost y Caviness 1980; Herkenham 1980b; Mason y Groos 1981; Simmons y Pearlman 1983b; Olavarria y Montero 1989; Nakamura et al. 2015), esto ha sido confirmado en prosimios (Marion

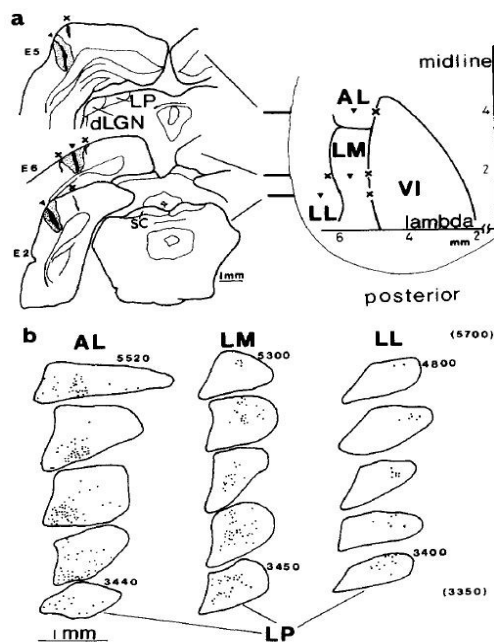
et al. 2013). Esta aferencia a capa 1 tiene gran relevancia a nivel funcional, ya que se ha sugerido en gato que esta proyección a capa 1 pueda ser capaz de controlar los niveles de excitabilidad en V1 (Brown y Marco 1967) y en galago la inhibición de esta aferencia provoca la abolición de la respuesta visual en el resto de capas corticales de V1 (Purushothaman et al. 2012). Estudios de enucleación ocular postnatal temprana en ratas, muestran que mientras existe una fuerte disminución de proyecciones TC entre el dLGN y V1, las del complejo LP con V1 se mantienen, pero en estos casos la principal aferencia a LP proviene de S1 permitiendo transmitir la información táctil del entorno a V1 (Négyessy et al. 2000). Esto se ha confirmado con estudios de ablación de V1 mostrando que las propiedades visuales del complejo LP se preservan en ausencia temprana de V1 (Tohmi et al. 2014; Allen et al. 2016).

6.1.3.1.2 *Cortezas extraestriadas*

Los primeros estudios en roedores de la vía extrageniculada mediante el uso de trazadores anterógrados y retrógrados, muestran mediante inyecciones retrógradas de HRP en cortezas extraestriadas laterales, la disposición de las neuronas TC en dLGN y LP (Dürsteler et al. 1979; Olavarria 1979; Sanderson et al. 1991). Así observan que en las regiones de corteza correspondientes con la actual LM-AL (área 18a) reciben terminales del dLGN y prácticamente de todos los núcleos del complejo LP (Sanderson et al. 1991), mientras que inyecciones que abarcan cortezas visuales laterales-temporales (P-POR- Ect) revelan que los cuerpos neuronales retrógradamente marcados se localizan mayoritariamente en niveles caudales del LP, especialmente en LPMC, y nunca aparecen somas retrógradas en dLGN (Coleman y Clerici 1980). Esta última proyección hacia cortezas temporales ya se había comprobado en muchos otros mamíferos como el hámster (Dürsteler et al. 1979) y la ardilla (Robson y Hall 1977). Las proyecciones del complejo LP a cortezas extraestriadas, descritas en roedores, terminan principalmente en capas intermedias (3-4) y 1, aunque en algunos casos también pueden aparecer campos terminales en capa 5 (Robson y Hall 1977; Olavarria 1979; Simmons y Pearlman 1983b; Tohmi et al. 2014; Nakamura et al. 2015; Roth et al. 2016).

Uno de los primeros estudios de la conectividad eferente del complejo LP en rata utilizando técnicas de autoradiografía y marcado retrógrado con HRP (Hughes 1977) describe las profusas proyecciones TC de este complejo nuclear a las áreas 18 y 18a, que recogen prácticamente todas las áreas visuales extraestriadas, junto con áreas corticales 7 y 20, correspondientes a corteza parietal posterior (PPtA) y corteza temporal asociativa (TeA) respectivamente; así como una proyección difusa al área 17 o V1. Olavarria (1979) describe en la rata que el complejo LP proyecta a LM-AL-LI (también denominada OC2L) de forma retinotópica siguiendo un gradiente

rostrocaudal en la porción lateral del LP, y a PM-AM (denominada OC2M), confirmado por Herkenham (1980), Sanderson et al. (1991) y Zhou et al. (2017). El complejo LP también va a estar proyectando a las cortezas extraestriadas laterales, actualmente denominadas P y LI, de forma retinotópicamente organizada (Figura 45). Además tras la ablación de V1, esta proyección retinotópica desde el LP a las áreas visuales asociativas estudiadas se va a mantener intacta (Olavarria 1979). Mientras que la lesión en las cortezas visuales asociativas laterales nombradas, van a causar fallos en el aprendizaje visual discriminativo en ratas (Gallardo et al. 1979; Thompson 1979).



Recientemente, el estudio de la conectividad TC del complejo LP mediante depósitos de dextranos fluorescentes en V1 y cuatro áreas visuales asociativas (LM, AL, RL y AM) muestra la distribución diferencial dentro del LP de las proyecciones bidireccionales a cada una de estas áreas (Figura 46, Tohmi et al. 2014). Estudios de neurona única en el complejo LP (Nakamura et al. 2015) confirman esta principal proyección, especialmente desde los núcleos LPL y LPMR, y en menor medida del LPMC a múltiples cortezas visuales extraestriadas en ratón. Así mismo se ha descrito un patrón laminar general dentro de estas cortezas. LPL va a terminar en capas intermedias formando pequeños grupos, mientras que LPMR y LPMC mayoritariamente alcanzan la capa 1 de una forma difusa y extensa (Nakamura et al. 2015).

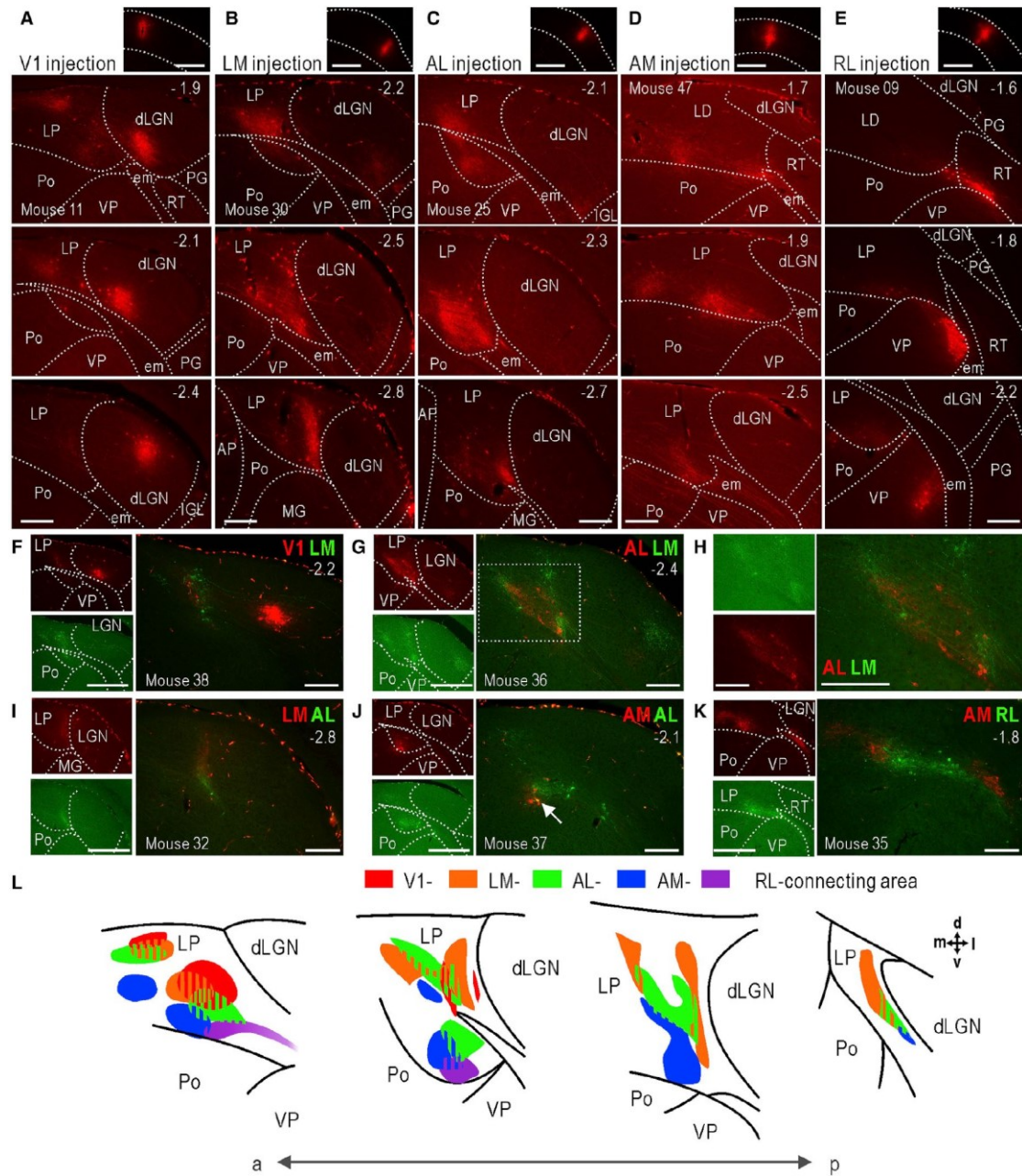
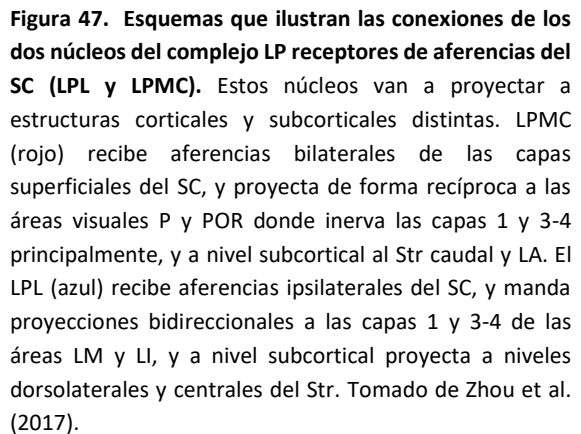


Figura 46. Organización de las conexiones marcadas retrógradamente entre el complejo LP y cinco áreas visuales consideradas (V1 (A), LM (B), AL (C), AM (D), RL (E)). (A-E) Microfotografías de secciones coronales de la corteza occipital del ratón donde aparecen los depósitos de dextranos fluorescentes en cada una de las áreas corticales donde se realizaron (paneles superiores) y secciones coronales talámicas donde se aprecia el marcaje producido por los distintos depósitos (paneles inferiores). Barras de calibración de 1mm (paneles superiores) y 200µm (paneles inferiores). (F-K) Microfotografías de secciones coronales talámicas tras el doble depósito de dos dextranos fluorescentes V1/LM (F), LM/AL (G-I), AL/AM (J), y AM/RL (K). En cada caso se muestran a la izquierda el marcado de cada una de las dos inyecciones por separado, y a la derecha el marcado superpuesto. En el caso H, las dos fotografías de la izquierda se corresponden con una magnificación del marcado en el caso G. Barras de calibración de 500µm y 200µm (imágenes del detalle del caso G). (L) Esquema resumen de la organización topográfica de las proyecciones de las neuronas TC del complejo LP hacia áreas corticales visuales representado en secciones talámicas coronales en una progresión antero-posterior. Ver lista de abreviaturas. Tomado de Tohmi et al. (2014).



En muchos casos, también se han descrito proyecciones a otra área situada en el polo temporal de roedores: la corteza perirrinal (PRh, o áreas 35 y 36), que en conjunto con el área visual asociativa postrrinal (POR)-área ectorrinal (Ect) y la corteza entorrinal (Ent) se denominan cortezas parahipocampales, y van a estar encargadas de proporcionar información sensorial altamente procesada al hipocampo (HC) (Eacott y Gaffan 2005; Furtak, Wei, et al. 2007; Agster y Burwell 2009). El área PRh junto a TeA y Ect poseen gran conectividad con cortezas auditivas asociativas, por lo que en algunos casos PRh se ha considerado como un área asociativa polimodal (visual y auditiva), además tanto PRh como TeA poseen fuertes conexiones recíprocas con la amígdala lateral (LA) (Coleman y Clerici 1980; Mason y Gross 1981; Shi y Davis 2001). Estas dos áreas, además, parecen jugar un importante papel en la vía encargada del miedo condicionado a estímulos auditivos o visuales, como se ha observado en estudios de marcado doble retrógrado en las áreas PRh y TeA mostrando que el origen de estas proyecciones se encuentra principalmente en la región medial del complejo LP (especialmente LPMC y de forma escasa en LPMR) y en menor medida del núcleo MGN (Figura 49) (Doron y Ledoux 2000; Nakamura et al. 2015).

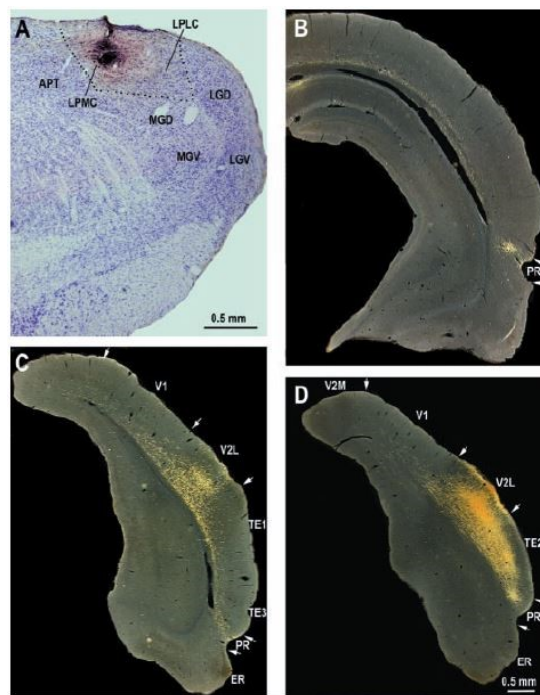


Figura 48. Distribución de las proyecciones TC del núcleo LPMC tras su marcado anterógrado poblacional. (A) Microfotografía a campo claro de una sección coronal talámica de rata mostrando la inyección de BDA ocupando toda la extensión del LPMC. (B, C, D) Microfotografías en campo oscuro mostrando la distribución de proyecciones axónicas terminales marcadas en tres secciones coronales representativas de la corteza temporal. En ellas se observan como principales dianas de los terminales, las cortezas visuales asociativas laterales, TeA (Te2, Te3) y PRh. Barras de calibración de 0,5mm. Ver lista de abreviaturas. Tomado de Shi y Davis (2001).

En estudios comportamentales de ratas que habían aprendido a reconocer un estímulo de condicionamiento aversivo (amenaza) a un estímulo auditivo, pierden por completo el miedo condicionado ante ese estímulo tras la lesión electrolítica del complejo LP (Shi y Davis 2001). La corteza PRh aparece fuertemente interconectada con cortezas visuales en roedores (McDonald y Mascagni 1996; Furtak, Allen, et al. 2007), recibiendo por ello información visual directamente

desde ellas o indirectamente a través del LPMC y LPMR. Finalmente, estos núcleos también mantienen conexiones con áreas Ect y Ent, por lo que se le ha atribuido un papel en el procesamiento, aprendizaje y memoria visuoespacial (Agster y Burwell 2009). En estudios recientes de resonancia magnética funcional (fMRI) en el ratón confirman la organización jerárquica de las áreas visuales y parahipocampales, concluyendo que el área visual asociativa POR actúa de puerta de salida de la información visual aferente a ella, desde el complejo LP y V1, transmitiéndola a las áreas parahipocampales Ect, PRh y Ent, donde se va a integrar con información de cortezas auditivas (AuD) (Bergman et al. 2016).

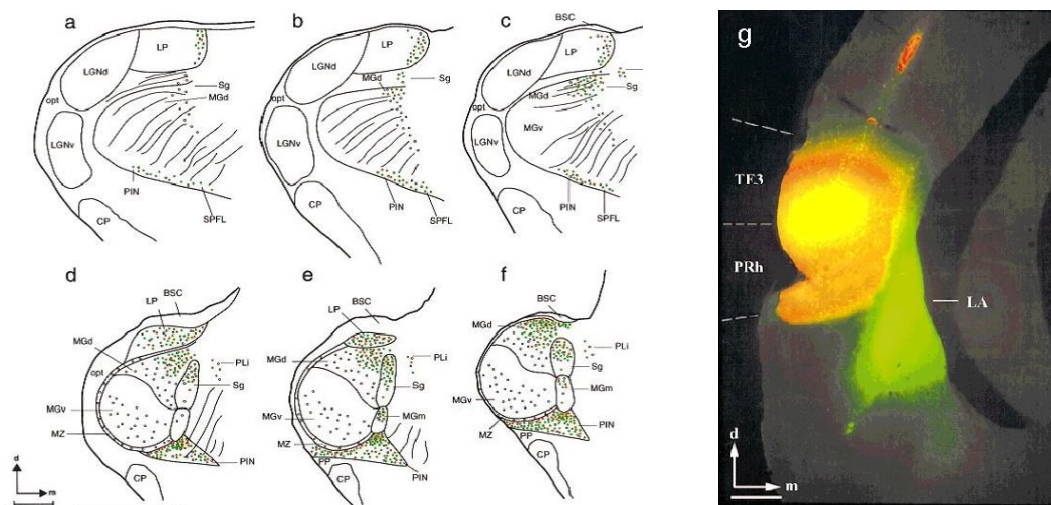


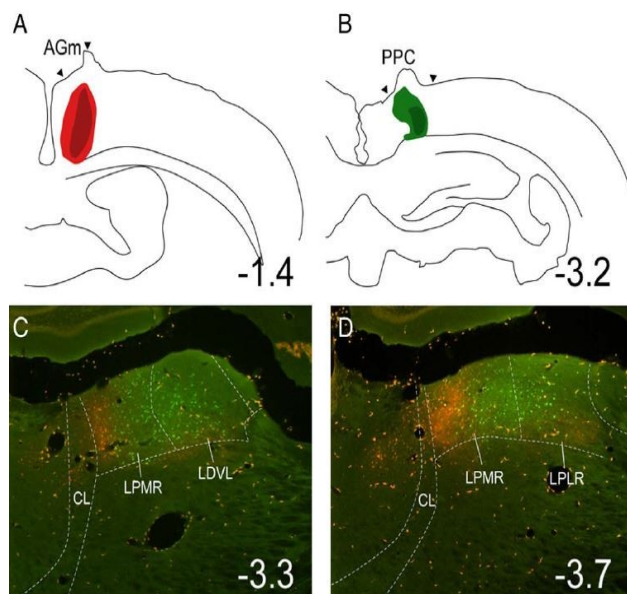
Figura 49. Esquemas coronales talámicos de rata en los que se muestra la distribución de neuronas retrógradamente marcadas tras un depósito en TeA-Ect-PRh y un depósito en LA. Los puntos negros se corresponden con un depósito de rodamina, los puntos de color verde con un depósito de CTB y los de color rojo marcan los somas que presentan doble marcado de los dos trazadores retrógrados. Así se observa marcado principalmente en LPMC (d,e), y en menor medida en LPMR en secciones rostrales (a-c). Distancia entre secciones 200µm. (g) Microfotografía de una sección coronal mostrando la extensión de los dos depósitos de trazadores retrógrados. Barras de calibración de 1mm (a-f) y 150µm (g). Ver lista de abreviaturas. Tomado de Doron y LeDoux (2000).

6.1.3.1.4 *Corteza parietales, cingulares y motoras*

Diversos estudios en roedores mediante trazado retrógrado, han demostrado que regiones restringidas dentro del complejo LP poseen conexiones recíprocas con la corteza motora secundaria (M2, también denominado AGm o Fr2) caudal y con la corteza parietal posterior (PPtA o PPT o PPC) dividida en rostral (PPtR), parietal posterior medial (MPtA) y parietal posterior lateral (LPtA) (Chandler et al. 1992; Reep et al. 2004; Kamishina et al. 2009; Nakamura et al. 2015; Olsen y Witter 2016).

A pesar de su situación entre las áreas somatosensorial primaria (S1) y visual asociativa RL, las cortezas parietales posterior, medial y lateral se distinguen de ellas por no recibir aferencias desde los núcleos VP y dLGN, aunque sí del complejo LP, LD y Po (Reep et al. 1994). Además,

esta área está fuertemente conectada con la corteza orbitaria medial (MO), M2, TeA, corteza retrosplenial (RSD/RSG) y prácticamente todas las áreas visuales asociativas (Reep et al. 1994). Lesiones pequeñas en estas cortezas parietales van a producir negligencia contralateral para estímulos visuales, auditivos y táctiles, así como déficits severos en el aprendizaje espacial que requiere de señales externas del entorno (Kolb y Walkey 1987; Reep et al. 2004). Estudios de trazado retrógrado en rata han demostrado que las cortezas parietales nombradas reciben proyecciones de la porción rostral del LPL y de la región central del LPMR (Figura 50) dejando lo que parece una colateral axónica en la periferia dorsal del Str (Hughes 1977; Kamishina et al. 2009).



Los primeros trabajos realizados en relación a las aferencias de la corteza cingulada (Cg: Cg1, Cg2) con técnicas de autoradiografía muestran una proyección de la región medial del complejo LP pero es difícil distinguir una topografía por el gran tamaño de las inyecciones (Beckstead 1979; Sukekawa 1988). En ratas, los primeros estudios que hacen referencia a estas proyecciones se realizaron mediante técnicas de degeneración axónica y depósitos de HRP (Reep et al. 1987), pero más tarde con técnicas más sensibles y precisas como el trazado retrógrado con CTB conjugado con alexas se ha detectado una distribución diferencial de proyecciones eferentes dentro del LPMR. Así, se observó que regiones caudales de M2 y Cg en ratas van a recibir proyecciones mayoritariamente de la porción medial del LPMR (Hicks y Huerta 1991; Condé et al. 1995; Conte et al. 2008; Kamishina et al. 2009; Nakamura et al. 2015). Es más, se ha comprobado que la proyección de LPMR a M2 es recíproca (Reep y Corwin 1999). Dentro

de la porción medial de LPMR, neuronas TC situadas en regiones más dorsales alcanzan principalmente Cg1 y Cg2, mientras que regiones ventrales van hacia M2 con una pequeña región de solapamiento central, pero no se ha podido comprobar la existencia de neuronas que proyecten a ambas regiones corticales por medio de colaterales axónicas; así como en el caso de las neuronas TC que proyectan a cortezas parietales por lo que parece tratarse de poblaciones independientes dentro del LPMR (Figura 51, Conte et al. 2008). La proyección del LPMR dorsal al Cg ha sido también comprobada con técnicas de trazado anterógrado con PHA-L en ratas (Vertes 2002), pero hasta el momento no existen trabajos que lo describan en el ratón. Estas conexiones con áreas motoras y parietales asociativas en roedores parecen influir en la atención durante el procesamiento visual espacial y la producción de movimientos dirigidos hacia ella, como se ha estudiado ampliamente en primates y carnívoros (Acuña et al. 1990; Hardy y Lynch 1992; Baldauf et al. 2005; Gharbawie et al. 2011; Córdoba-Claros 2017). Mientras que la proyección del complejo LP a Cg podría estar también implicada en mecanismos de dirección de la atención y de la negligencia contralateral en caso de su lesión (Hicks y Huerta 1991; Reep y Corwin 1999, 2009).

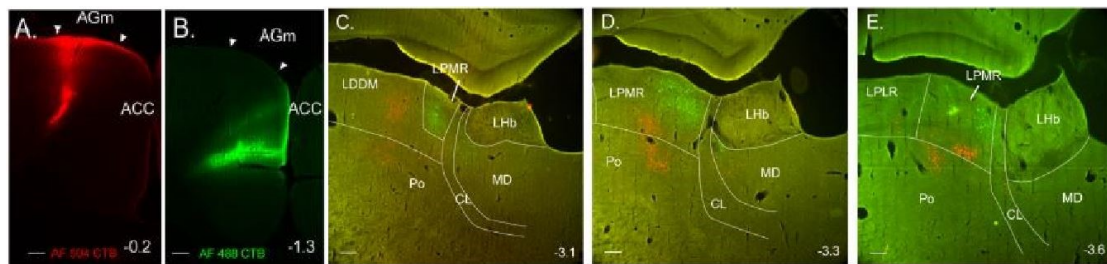


Figura 51. Distribución de las neuronas del complejo LP retrógradamente marcadas que proyectan a las áreas motora y cingular anterior. (A,B) Microfotografías de secciones coronales donde se muestran los depósitos de los trazadores retrógrados: CTB-594 en M2/AGm (color rojo, A) y CTB-488 en Cg/ACC (color verde, B). (C-E) Microfotografías de secciones sagitales talámicas de rata donde aparecen los somas retrógradamente marcados de cada depósito, observando la segregación en dos poblaciones, una dorsal y otra ventral de las neuronas TC dentro de la región medial del LPMR proyectando a cada área cortical. Se indican los niveles AP respecto a bregma (en mm) en cada imagen. Ver lista de abreviaturas. Tomado de Conte et al. (2008).

En primates se han descrito proyecciones desde el complejo pulvinar a la región de los campos oculares frontales (FEF) de la corteza frontal involucrados en los movimientos oculares sacádicos (Huerta et al. 1987). Estudios funcionales también en primates han descrito células en el complejo pulvinar que responden incrementando su descarga con movimientos intencionados dirigidos a alcanzar algo (denominadas *reaching cells*), mientras que no responden al movimiento pasivo de la extremidad, y muestran dependencia de estados de atención o motivación del individuo (Cudeiro et al. 1989). Lo que sugiere que esta región determinada del pulvinar que está activándose podría actuar informando indirectamente a M1

de la ejecución inmediata de un movimiento intencionado para alcanzar un objeto en el espacio. Pero hasta el momento, no se han identificado estas conexiones en roedores.

6.1.3.1.5 *Cortezas retroesplénicas*

La corteza retroesplénica (o áreas 29 y 30) forma parte de una red interconectada entre áreas corticales visuales, áreas hipocámpicas y parahipocámpicas, y núcleos talámicos, en la que participan neuronas que codifican información espacial. Lo que se ha confirmado tras la identificación de la existencia en la corteza retroesplénica de neuronas que responden a direcciones preferentes de la cabeza en la corteza retroesplénica granular (RSG o área 29), junto al trazado axónico de sus extensas proyecciones con áreas parahipocámpicas y talámicas (Vann et al. 2009; Czajkowski et al. 2014). Las principales proyecciones de la corteza retroesplénica disgranular (RSD o RSA o área 30) van a ser de forma bidireccional a las áreas visuales asociativas y cingulares Cg1/Cg2; mientras que RSG en roedores está conectada con áreas parietales posteriores, prefrontales, el subículo y el área M2 (o Fr2), núcleos talámicos del grupo anterior y LD (Van Groen y Wyss 1992; Reep et al. 1994; Yamawaki et al. 2016). Se ha observado que las alteraciones de estas conexiones afectan a un gran número de funciones cognitivas como tareas de aprendizaje y memoria espacial y contextual, así como aspectos sensorio-motores de la navegación espacial del sujeto, por lo que esta área parece poseer un claro papel codificando y almacenando información espacial (Vann et al. 2009; Czajkowski et al. 2016; Yamawaki et al. 2016). Estudios de marcado retrógrado doble mediante trazadores fluorescentes en RSD y un área cortical altamente interconectada con ella, la corteza visual asociativa PM, muestran somas sin una organización aparente limitada al polo rostral del complejo LP (Figura 52, Chandler et al. 1992; Reep et al. 1994; Kamishina et al. 2009). Hay que añadir que esta área PM se ha relacionado con el procesamiento visual y reconocimiento de escenas durante la navegación espacial en estudios con ratones situados en un entorno de realidad virtual (Roth et al. 2012). En contraposición, un estudio de marcado con vectores virales afirma la existencia de una pequeña proyección del núcleo LPL a RSD/RSG, constituyendo la primera proyección descrita de este núcleo hacia áreas corticales no visuales (Nakamura et al. 2015).

Recientemente, estudios de imagen mediante tomografía de emisión de positrones (PET) utilizando trazadores para la visualización del sistema dopaminérgico en la rata, han demostrado esta conexión bidireccional entre la corteza retroesplénica y el complejo LP, relacionándola con patologías del sistema motor como el Parkinson. Esta comunicación con RSD/RSG constituye parte del sistema principal de direccionamiento de la cabeza ante un estímulo visual, por lo que

va a estar muy relacionada con la atención visual y se ha asociado con problemas visuoespaciales en pacientes con Parkinson (Kordys et al. 2017). Incluso se han descrito células en esta región de LPMR que proyectan a RSD/RSG y responden en relación a la velocidad con la que se desplaza el individuo, por lo que este núcleo HO se vería implicado en detectar las inconsistencias entre el movimiento propio del individuo y el movimiento del entorno en el que se desplaza, mediante integración sensori-motora en gran medida gracias también a sus conexiones con áreas parahipocampales (Cho y Sharp 2001; Roth et al. 2016).

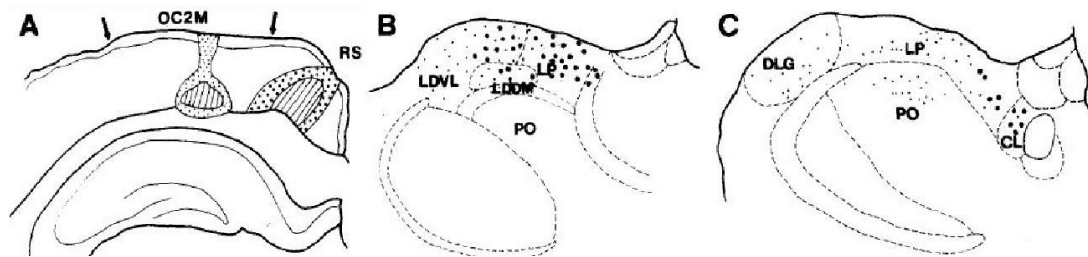


Figura 52. Localización de las neuronas retrógradamente marcadas del complejo LP que proyectan áreas visuales extraestriadas y retroespleniales. Secciones coronales de encéfalo de rata donde se representan dos inyecciones de trazadores retrógrados en PM-OCM2 (fast blue, puntos pequeños) y en RS-RSD (fluorogold, puntos grandes) (A) y se han dibujado los somas marcados retrógradamente por estos depósitos en una sección talámica rostral del complejo LP (B), donde se aprecia la principal región de proyección a RSD, y una más caudal (C). Ver lista de abreviaturas. Modificada de Chandler et al. (1992).

6.1.3.1.6 *Córtex frontal asociativa y prefrontal*

En la literatura aparecen escasos trabajos de conectividad que relacionen estas áreas frontales de roedores con el complejo LP, e incluso en estudios con trazadores anterógrados muy eficaces como PHA-L no han revelado de forma concluyente conexiones bidireccionales entre estas dos estructuras (Vertes 2002; Hoover y Vertes 2007). Estudios mediante extensas inyecciones de trazadores retrógrados (WGA-HRP, FG y CTB) en estas áreas corticales han marcado escasos somas ventralmente en niveles rostrales del complejo LP, marcando en mayor medida somas en muchos otros núcleos talámicos (Sukekawa 1988; Létang et al. 1998; Martín-Cortecero y Nuñez 2016).

Finalmente, estas proyecciones muy escasas a capas superficiales de la corteza prefrontal (PrL) en ratas se han identificado en algunos casos mediante marcado de neuronas aisladas con vectores virales (Nakamura et al. 2015).

6.1.3.1.7 *Córtex orbitales*

Los trabajos de conectividad entre el complejo LP y las cortezas orbitarias en roedor son también escasos. El estudio de Reep et al. (1996) describe mediante trazadores retrógrados las principales aferencias a las distintas subdivisiones de la corteza orbitaria y en ningún caso

nombrada entre los aferentes talámicos al LP. Pero en varias divisiones de la corteza orbitaria en roedores sí se han descrito fuertes conexiones entre la porción lateral del núcleo dorsomedial (DM) y del núcleo central lateral (CL) (Saalman 2014). Debido a criterios variables en cuanto a la delimitación de estos dos núcleos con el LPMR, posiblemente algunas de las neuronas marcadas pertenezcan al LPMR medial (Hoover y Vertes 2011).

6.1.3.1.8 *Corteza insular*

En cuanto a la corteza insular la mayor parte de trabajos que la relacionan al complejo pulvinar se han realizado en primates. Se han descrito mediante el trazado axónico con aminoácidos tritiados y HRP las conexiones recíprocas entre el núcleo medial del complejo pulvinar y la corteza insular posterior atribuyéndoles una función de integración múltiples modalidades sensoriales en esta región insular (Mufson y Mesulam 1984). En el trabajo de Jezzini et al. (2015) se definió mediante registro electrofisiológico una región en la corteza insular ventral involucrada con el comportamiento social de acercamiento hacia conoespecíficos y a continuación, en esa misma región se realizaron depósitos de trazadores retrógrados, a través de los cuales se observaron somas marcadas en el núcleo medial del complejo pulvinar.

6.1.3.2 Subcorticales

6.1.3.2.1 *Estriado dorsal*

Estudios de marcado retrógrado en el estriado dorsal (Str), demuestran que neuronas del complejo LP proyectan al estriado en la rata de forma topográficamente organizada (Erro et al. 2002; Cheatwood et al. 2003). La principal proyección del complejo LP es la porción dorsal del Str, que coincide con la región de principales aferencias a las cortezas M2, Cg, PPt, PRh, corteza orbitarias y visuales estriada y extraestriadas entre otras, actuando aparentemente como nexo en la red asociativa multimodal cortical y de dirección de la atención (Serizawa et al. 1994; Cheatwood et al. 2003). El estudio de doble marcado retrógrado demuestra que una neurona del LP va a alcanzar simultáneamente el Str y la corteza visual, así como una neurona de la SNr va a terminar a la vez en el complejo LP y el Str, o en el SC y el Str (Takada 1992).

Estudios con técnicas más actuales de marcado anterógrado en rata (Funaki et al. 1998), muestran que existe una proyección directa del LPMR, siendo una proyección difusa a las regiones dorsales de las divisiones central del estriado, y una proyección densa a las regiones periféricas del mismo. Esta proyección tálamo-estriatal podría tratarse de una colateral del haz de fibras ascendente a corteza o proceder de neuronas talámicas distintas, donde también

aparecen campos terminales de proyecciones cortico-estriatales desde M2 y PPt (Figura 53) (Cheatwood et al. 2003, 2005; Kamishina et al. 2008). También se ha descrito otra proyección desde la región rostral del LPL a la porción periférica dorsal del Str, como se ha comprobado con trazado axónico anterógrado de BDA (Kamishina et al. 2008). Se ha descrito cierta topografía de conexiones al Str, ya que regiones más centrales del LPMR proyectan a la periferia dorsal del Str y continúan alcanzando PPt y la corteza visual PM, y regiones más mediales del LPMR proyectan al Str central en niveles muy caudales y ascienden hasta M2 (Erro et al. 2002, Kamishina et al. 2008). Esta región dorsal/dorsolateral/caudal del Str, que recibe aferencias de múltiples áreas corticales visuales y visuomotoras (Updyke 1993; Harting et al. 2001), ha demostrado jugar un papel fundamental en circuito nervioso implicado en el direccionamiento de la atención en muchos otros mamíferos, así como en el fenómeno conocido como “visión ciega” que permite realizar movimientos guiados visualmente tras la ablación completa de V1, descrita en ardillas y tupayas (Coyle y Snyder 1969; Van Vleet et al. 2003; Cowey 2010). La fuerte relación de esta proyección del complejo LP al Str y la LA, ha permitido sugerir la implicación del Str en el procesamiento de la información visual requerida para producir un comportamiento orientado determinado por la actividad somato-motora. E incluso ayudar en la realización de movimientos oculares sacádicos, ya que parte de los núcleos del LP que proyectan al Str reciben aferencias del SC (Harting et al. 2001), y movimientos de la cabeza orientados a un estímulo visual sin ser necesaria una percepción consciente de los mismos, lo que en animales con visión lateral es decisivo para escapar de estímulos visuales peligrosos (Takada 1992; Doron y LeDoux 1999; Day-Brown et al. 2010). En el complejo pulvinar de primates y humanos se ha descrito que su inactivación o lesión puede llevar a un déficit en la producción, mantenimiento y selección de sacadas dirigidas hacia el campo visual contralateral a la lesión (Arend et al. 2008; Snow et al. 2009; Wilke et al. 2010).

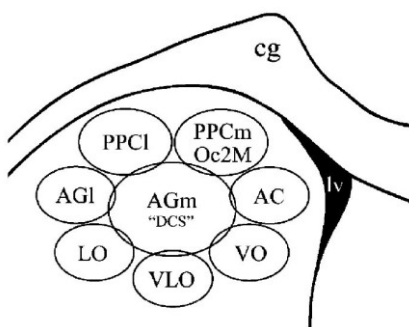


Figura 53. Representación esquemática sobre una sección coronal del encéfalo de rata de la topografía de los campos terminales cortico-estriatales en el estriado dorso-central. Tomado de Cheatwood et al. (2005).

6.1.3.2.2 *Amígdala*

Algunos de los trabajos mencionados sobre las eferencias del complejo LP a cortezas parahipocampales, también describen una conexión monosináptica ipsilateral desde el

complejo LP a la amígdala lateral (LA) de roedores, esta vía va a tener un importante papel en alertar al animal del estímulos visuales potencialmente peligrosos antes de la percepción visual consciente de ese estímulo y en respuestas defensivas como el *freezing* ante la aparición de depredadores (Doron y Ledoux 1999; Day-Brown et al. 2010a; Wei et al. 2015). Para este tipo de reacciones defensivas ante un estímulo amenazante que ponen en peligro la propia supervivencia el complejo LP es imprescindible ya que actúa como nexo de las proyecciones del SC hacia la LA (Figura 54), este fenómeno también se ha denominado “miedo subliminal” (Morris et al. 1999; Liddell et al. 2005; Day-Brown et al. 2010a).

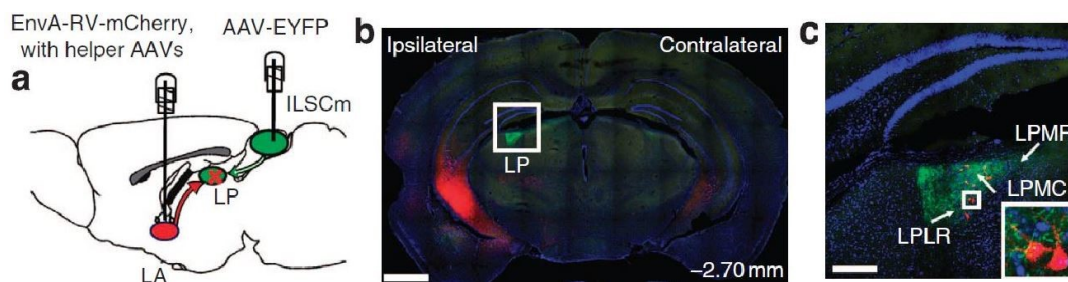


Figura 54. Marcado de la conectividad del circuito formado por SC, LPMC y LA. (a) Esquema de la localización del vector anterógrado AAV (color verde) en el SC y el plásmido *helper* del vector AAV en LA, el cual se transporta retrógradamente por las aferencias del complejo LP para marcar de forma transináptica en rojo los somas de neuronas en LP que reciben proyecciones coliculares. (b,c) Microfotografías de secciones coronales del encéfalo de ratón donde se observa el depósito en LA (rojo) y la colocalización de terminales coliculares (verde) y somas en LPMC que intervienen en este circuito. Barras de calibración de 1mm (a) y 250µm (b). Ver lista de abreviaturas. Tomado de Wei et al. (2015).

En ratas, mediante estudios de trazado retrógrado con FB, diamidino yellow y CTB desde LA y de trazado axónico anterógrado con BDA y vectores AAV, se ha observado que principalmente la región dorsomedial del LP caudal (LPMC) es la que presenta mayor densidad de somas marcados, pero depósitos en niveles muy anteriores de LA también marca somas en regiones más rostrales del complejo LP (Figura 55, Doron y LeDoux 1999; Shi y Davis 2001; Wei et al. 2005). Por supuesto, de manera paralela existe una ruta cortical en la que aparecen involucradas múltiples cortezas visuales, temporales y orbitofrontales necesarias para la identificación consciente del estímulo aversivo (Morris et al. 1999).

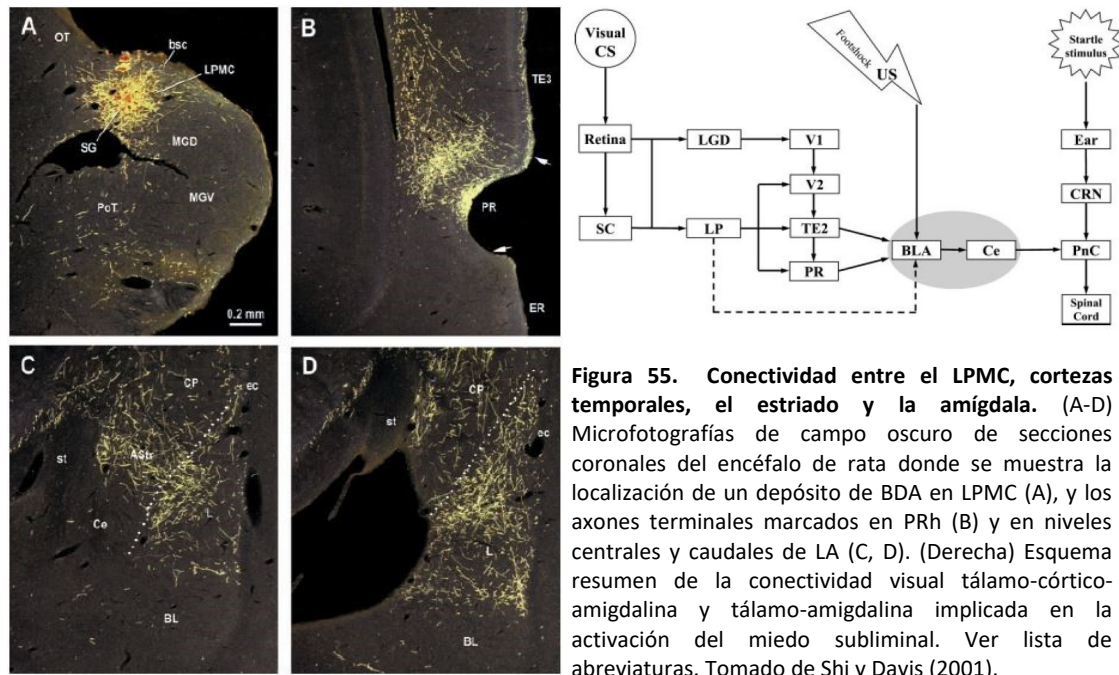


Figura 55. Conectividad entre el LPMC, cortezas temporales, el estriado y la amígdala. (A-D) Microfotografías de campo oscuro de secciones coronales del encéfalo de rata donde se muestra la localización de un depósito de BDA en LPMC (A), y los axones terminales marcados en PRh (B) y en niveles centrales y caudales de LA (C, D). (Derecha) Esquema resumen de la conectividad visual tálamo-córtico-amigdalina y tálamo-amigdalina implicada en la activación del miedo subliminal. Ver lista de abreviaturas. Tomado de Shi y Davis (2001).

6.1.4 Estudios de neurona única

La reconstrucción completa de la morfología y conectividad axónica de neuronas aisladas ya sea en 2 o en 3 dimensiones, tiene un gran valor ya que nos va a permitir resolver múltiples cuestiones que en estudios a nivel poblacional son muy difíciles de determinar. Una de ellas es la posibilidad de colaterales dentro de las neuronas de proyección TC, ya sean con la finalidad de inervar múltiples estructuras subcorticales de camino a la corteza o para inervar múltiples áreas corticales simultáneamente. En cualquier caso, este hecho podría tener gran repercusión en procesos atencionales o en respuestas motoras inconscientes (Day-Brown et al. 2010a). Es una cuestión que siempre ha quedado abierta en muchos estudios que utilizaban doble marcado retrógrado (Conte et al. 2008; Chomsung et al. 2010), en este aspecto el marcado de neurona única nos permite responder de forma taxativa esta cuestión.

Pocos trabajos han estudiado la existencia de las colaterales en las proyecciones talámicas. Las primeras evidencias de colaterales axónicas mediante degeneración retrógrada en el LGN y el complejo LP fueron obtenidas por Diamond y Hall (1969); estos autores argumentaron que en mamíferos no primates, como el erizo y el gato, aparecen colaterales axónicas las neuronas TC del LGN y el complejo LP debido a que son sistemas más primitivos, mientras que en las neuronas del LGN de primates han perdido estas colaterales axónicas porque se ha vuelto más específico. Harting et al. (1973) estudió también las colaterales axónicas desde el complejo pulvinar de tupayas mediante pequeñas lesiones que provocaban degeneración retrógrada muy controlada en la corteza temporal. Y por supuesto varios estudios de doble trazado retrógrado axónico han

comprobado la existencia de colaterales axónicas en el complejo pulvinar de primates, tupayas y gatos (Kaufman et al. 1984; Cusick et al. 1985; Tong y Spear 1986; Miceli et al. 1991).

Existen pocos trabajos en los que se presenten reconstrucciones de neurona única en uno de ellos mediante marcado yuxtacelular con rodamina se realizó la reconstrucción bidimensional una neurona localizada en el LPMC que proyectaba densamente a áreas extraestriadas laterales (capas 3-4), Ect y de forma muy difusa a V1 (Nosedá et al. 2010a, 2011). En el trabajo de Nakamura et al. (2015), se muestran las reconstrucciones en 3D de 7 neuronas del LPL, 4 neuronas del LPMR y 5 neuronas del LPMC que habían sido infectadas con el vector viral Sindbis-GFP, aunque la delimitación que realizan del complejo LP es únicamente en base a vGluT2 por lo que no es muy precisa. En todos los casos se describieron colaterales axónicas en el RTN; las neuronas localizadas en el LPL y LPMR también emitían colaterales en el Str central dorsomedial y en la periferia dorsal, mientras que las neuronas del LPMC proyectaban al Str caudodorsal y caudolateral. Finalmente, describen neuronas del complejo LP que no mandan axones de proyección cortical sino que terminan exclusivamente en dianas subcorticales (Str y LA).

6.1.5 Organización funcional del complejo LP

El complejo nuclear LP parece poseer una amplia variedad de papeles funcionales principalmente relacionados con el procesamiento de la información visual, pero siempre considerando que en ratones es un complejo que apenas se ha comenzado a estudiar en profundidad (Huberman y Niell 2011). Muchas de estas funciones ya las hemos ido mencionando al estudiar las principales aferencias y eferencias descritas del complejo LP. Los núcleos de este complejo en mamíferos se consideran en base a su patrón de conexiones aferentes y eferentes *high order*- HO (Reichova y Sherman 2004). La vía extrageniculada vehicula principalmente información cortical y del SC a todas las cortezas visuales recíprocamente y muchas otras áreas corticales. Las proyecciones recíprocas a cortezas visuales pueden servir como vías de conducción de la información visual en paralelo con las corrientes de procesamiento cortico-corticales, creando circuitos de reentrada y jerarquizando el flujo de información (Grieve et al. 2000; Sherman y Guillery 2006, 2011). A pesar de ello, regiones mediales del LP van a proyectar a tal cantidad de áreas asociativas a través de toda la corteza (Kamishina et al. 2009), que no podemos atribuirle una función únicamente visual a este núcleo, aunque sí parece ser la predominante (Jones 2007).

Además, se ha demostrado que sus neuronas son capaces de realizar integración multisensorial (Allen et al. 2016) y del movimiento de alta complejidad, ya que sus neuronas,

con grandes campos receptivos, que son capaces de responder a una determinada dirección del estímulo, a cambios en el tamaño, de intervalos temporales y espaciales del movimiento, es decir, son selectivas a patrones complejos de movimientos de uno o más objetos en el campo visual (Merabet et al. 1998; Dumbrava et al. 2001). Por lo que puede ser que las neuronas del LP posean una variedad de estímulos para su activación mucho más extensa de lo que se conoce (Van Le et al. 2013; Gale y Murphy 2014; Allen et al. 2016). Todo esto es evidencia de que el procesamiento global del movimiento inconsciente tiene lugar en estructuras subcorticales. Experimentos en gatos afirman que estas neuronas selectivas de patrones específicos de objetos en movimiento se localizan en la región equivalente al LPMR en roedores y están conectadas con determinados módulos corticales para procesar determinadas características del campo visual (Merabet et al. 1998). Experimentos de lesiones bilaterales del LP en rata producen deficiencia severa en la orientación espacial en nuevos ambientes (Klingberg y Klingberg 1980).

Para finalizar, también a estas proyecciones se les ha atribuido una importante función en la sincronización de poblaciones neuronales localizadas en múltiples áreas visuales para favorecer la atención visual selectiva en función de la relevancia del estímulo visual en un contexto (Diamond 1976; Desimone et al. 1990; Shipp 2004; Saalmann et al. 2012), así como participando en comportamientos motores guiados visualmente. Sin embargo, en otros estudios parece implicado en el procesamiento multisensorial de la información relacionada con estímulos aversivos y nociceptivos, y posiblemente en otras funciones asociativas en base a sus eferencias con centros relacionados con funciones cognitivas y límbicas. Por lo que hay autores que ponen en duda que la función del complejo LP del ratón sea puramente visual o también posee funciones asociativas no sensoriales (Goossens et al. 2007; Nosedá et al. 2010a; Allen et al. 2016; Baldwin et al. 2017).

II PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

Hipótesis

El conocimiento del entramado de proyecciones desde los distintos núcleos del tálamo visual a sus dianas corticales y subcorticales es clave para entender cómo la red procesa los distintos aspectos de la información visual.

La similitud funcional de las dos principales vías del tálamo visual (geniculada y extrageniculada) con las vías TC recientemente caracterizadas en el sistema somatosensorial (Clascá et al. 2016), sugiere **que los axones de algunos núcleos visuales podrían innervar varias áreas corticales mediante colaterales, de acuerdo a un patrón relacionado con la retinotopía descrita en esas áreas.**

Con el fin de desentrañar y cuantificar morfométricamente el cableado de las vías TC visuales del ratón, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Establecer criterios consistentes para delimitar el dLGN y las tres divisiones del LP (LPL, LPMC, LPMR) en base a sus características citoarquitectónicas y neuroquímicas, y determinar el número de neuronas que forman cada uno de estos núcleos.
2. Determinar a nivel poblacional la distribución tangencial de las proyecciones TC del dLGN con referencia a la organización retinotópica descrita por otros autores en las áreas visuales.
3. Determinar a nivel poblacional la distribución en la corteza cerebral de las proyecciones TC del LPL, LPMC y LPMR y su posible relación con la retinotopía descrita en algunas áreas, así como su distribución en estructuras subcorticales.
4. Investigar la posible existencia de diferencias en la distribución laminar y/o en el tamaño de las varicosidades de los axones de dLGN y LP en las áreas corticales que éstos innervan.
5. Utilizar para el análisis de la estructura de los axones TC la transfección de neuronas individuales con el fin de cuantificar morfométricamente sus patrones de ramificación axónico.

III MATERIALES Y MÉTODOS

1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para la realización de los experimentos que aparecen en este trabajo se emplearon un total de 206 ratones (*Mus musculus*) macho adultos de la cepa C57BLACK6 (C57/BL6) de entre 26 y 30 gramos de peso. Tomamos en consideración estudios que demuestran que la mayoría de cepas de ratón albino sufren degeneración retiniana inducida por la luz, por lo que escogimos la cepa C57BL (LaVail et al. 1987). Todos los procedimientos incluidos en el presente trabajo se han desarrollado de acuerdo con las normas y leyes de la Unión Europea (Directiva 2010/63/UE) y España, actualizadas en el Real Decreto 53/2013, del 1 de febrero, para el uso de animales en investigación. Se tomaron todas las medidas necesarias para minimizar el número de sujetos empleados así como su sufrimiento, bajo supervisión del Comité de Ética para la Experimentación Animal de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. Los animales fueron adquiridos en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, donde dispusieron hasta su perfusión de agua y comida *ad libitum*.

A pesar de que hace unos años no se hubiera imaginado usar como modelo experimental el ratón para el estudio de la conectividad tálamo cortical del sistema visual, en la actualidad es un modelo ampliamente utilizado para estudios tanto anatómicos como electrofisiológicos relacionados con el sistema visual (Human Brain Project, BRAIN Initiative, Allen Brain Atlas-Mouse Connectivity, MouseLight Project- Janelia Campus). Debido a su condición de mamífero, junto a su pequeño tamaño, alta tasa de reproducción, gran facilidad para su cría, bajo coste de mantenimiento y gran variedad de líneas transgénicas, hacen del ratón un modelo idóneo para múltiples estudios. Además el pequeño tamaño de su encéfalo facilita en gran medida los procedimientos quirúrgicos, así como el procesamiento y análisis en estudios anatómicos de trazado de vías neuronales, como en este caso.

Las Tablas 7-9 muestran un resumen los animales usados. Es necesario indicar que este elevado número de animales utilizados es acorde al estudio en profundidad de la conectividad de cuatro núcleos distintos, anatómicamente y funcionalmente independientes; pero principalmente se debe a la puesta a punto de diversas técnicas de marcado y de análisis de material, como el desarrollo de la transfección de vectores virales AAV para el marcado de neuronas independientes o la realización de un atlas anatómico que recogiera la delimitación de las secciones sagitales que constituyen el polo temporal del encéfalo de ratón. Además, a pesar de la gran cantidad de animales que presentan depósitos exitosos, este trabajo por su extensión no incluye la totalidad de los mismos, sino que realizamos una selección de casos que

incluiremos en esta tesis doctoral. Por supuesto, en este total de casos excluimos algunos animales que no sobrevivieron al procedimiento quirúrgico, en los que el trazador escogido no se transportó correctamente, los utilizados para poner a punto nuevas técnicas de trazado, así como los casos no exitosos en los que el depósito había contaminado áreas o núcleos adyacentes. Éstos últimos fueron descartados en este trabajo por aportar mayor confusión en la interpretación de los resultados, pero son válidos para responder otras preguntas que no abordamos en este trabajo. Así, hemos reducido en la medida de lo posible el núcleo de casos incluidos en nuestro análisis a 38 experimentos de depósitos columnares de trazadores retrógrados en una o múltiples áreas corticales, 52 animales con microinyecciones iontoforéticas poblacionales de trazadores anterógrados en el tálamo y el colículo superior y 8 casos de neurona única ya sea mediante iontoforesis o electroporación. Se descartaron para este trabajo, muchos experimentos de neurona única en los que obtuvimos 2 o más neuronas marcadas situadas muy cercanas entre sí que dificultaban su reconstrucción. Por último, 8 animales más se utilizaron para experimentos de control histológico e inmunomarcado para análisis estereológico, y la realización de un mapa plano de la superficie cortical del ratón.

1.1 Anestesia y cirugía

Con el fin de facilitar la colocación en el aparato estereotáxico de los animales, éstos fueron anestesiados intraperitonealmente con una mezcla de solución salina con ketamina (79mg/kg; Imalgene® 500; Merial Laboratorios, Barcelona, España) y xilacina (16mg/kg; Rompun® 2%; Bayer, Barcelona, España). Tras la inducción de la anestesia, se les rasuró la superficie y se colocaron en el marco estereotáxico (Kopf®, David Kopf Instruments; Tujunga, California, EE.UU.). Durante el resto de la cirugía se les mantuvo con anestesia inhalatoria de isoflurano 0,5-1% (Abbvie Spain, Madrid, España) en un flujo de oxígeno de 0,5l/min, administrada por un aparato de anestesia inhalatoria veterinaria adaptado a pequeños animales (RX Cisneros S.L. Electromedicina, Madrid, España), a través de una máscara de fijación especial (Kopf®, David Kopf Instruments, Tujunga, California, EE.UU.) conectada a un contenedor de carbono activo que eliminaba el exceso de isofluroano mediante una bomba de vacío (Fluovac System, Harvard Apparatus, Massachusetts, EE.UU.). Esta anestesia inhalatoria junto al uso de una manta térmica (T-Pump®; Gaymar Industries, Orchard Park, Nueva Jersey, EE.UU.) de agua circulante a 37° C que evitaba la posible aparición de una hipotermia y a la aplicación de vaselina líquida para la protección de la córnea contra la desecación, posibilitaba la realización de largas cirugías bajo condiciones estables.

Una vez fijado el animal al aparato estereotáxico, se comprobaba que los reflejos habían quedado abolidos para así poder realizar una incisión longitudinal con un bisturí estéril en el cuero cabelludo a nivel de la línea media, se rebatió la piel lateralmente y así como la galea aponeurótica, dejando expuesto el cráneo para poder tomar las coordenadas con una pipeta de vidrio acoplada a un adaptador utilizando un microscopio quirúrgico (tipo II Zeiss, Jena, Alemania). Especialmente en los experimentos con trazadores retrógrados en las distintas cortezas visuales, se alargó la apertura cutánea caudal y lateralmente, y se desinsertaron dependiendo del caso los músculos temporal y/o masetero y/o cervico-auricular (Krinke 2000) mediante disección roma para evitar un sangrado excesivo. En estos casos, también se pulió la superficie del cráneo con peróxido de hidrógeno disuelto en agua destilada con el fin de observar por transparencia el seno transversal, el cual sirvió de referencia en los experimentos de trazado retrógrado (Figura 56). Tras comprobar que los puntos de referencia bregma y lambda se encontraban a la misma distancia vertical, se localizaron sobre la superficie del cráneo las coordenadas anteroposterior (AP; tomando bregma o lambda como punto de referencia) y mediolateral (ML; desde la línea media) de la región de interés, siguiendo el Atlas de ratón de Franklin y Paxinos (2008) (Figura 57). A excepción de los experimentos de trazado retrógrado, en los que se tomó como referencia para el eje AP la posición del seno transversal y para ML la línea media. Se realizó una pequeña osteotomía para reducir el espesor del hueso utilizando una broca de dentista (Dremel® modelo 225, Dremel Europe, Madrid, España), y con el fin de no atravesar las meninges y dañar la superficie cortical, se levantó la lámina ósea utilizando un bisturí estéril. Tras el procedimiento quirúrgico, se suturó la herida con hilo de seda trenzada estéril 4/0 (Lorca-Martín, Murcia, España) y se desinfectó la herida con solución antiséptica de povidona iodada (Betadine®, Viatrix, Burdeos, Francia).



Figura 56. Fotografía del cráneo del ratón donde se muestra marcado en negro la posición del seno transversal que tomamos como referencia en los experimentos retrógrados.

Finalmente, se le inyectaron depósitos subcutáneos de suero salino (1-2 ml/g) para evitar la deshidratación y una dosis de buprenorfina (Buprex 0,3 mg/mL, Schering Plough, S.A.) como analgésico postoperatorio. Los animales se mantuvieron bajo observación hasta que se

recuperaron de los efectos de la anestesia, tras lo cual fueron estabulados en el animalario hasta su perfusión.

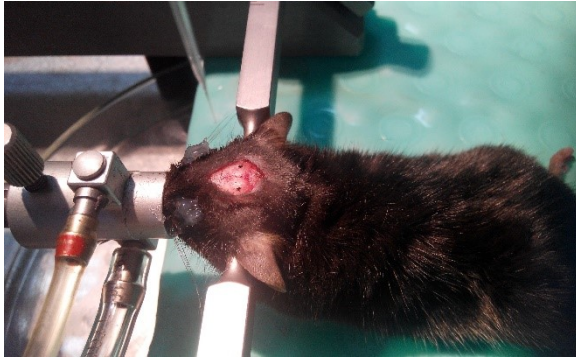


Figura 57. Instantánea realizada durante el procedimiento quirúrgico para la aplicación de un trazador anterógrado cargado en una pipeta de borosilicato y donde se muestran dos puntos marcados en negro correspondientes a las coordenadas AP y ML del dLGN.

2 EXPERIMENTOS DE TRAZADO POBLACIONAL

Para poder estudiar en detalle las proyecciones aferentes de los núcleos talámicos dLGN y el complejo LP comenzamos con un abordaje de marcado poblacional que nos diera información del comportamiento de micropoblaciones de neuronas antes de pasar al estudio de neuronas aisladas.

2.1 Experimentos de trazado retrógrado

Inicialmente utilizamos trazadores retrógrados fluorescentes que, mediante pequeños depósitos columnares, nos permitieran mediante microscopía de epifluorescencia determinar los principales núcleos talámicos que proyectan a las cortezas visuales estriada y extraestriadas o asociativas en el ratón. Además la disposición de los somas marcados nos ayudó a marcar los límites de los distintos núcleos del complejo LP sin pérdida significativa de su fluorescencia durante todo el análisis al ser suficientemente fotoestables.

Debido al pequeño tamaño de las áreas corticales visuales extraestriadas en el ratón, los depósitos debían ser muy restringidos pero de suficiente tamaño para producir un marcado completo del soma. Por esto probamos con varios trazadores retrógrados variando su concentración, así como con varios parámetros de inyección por presión de los mismos hasta poner a punto el método de marcado. En todos los experimentos de trazado retrógrado, se han efectuado dos o tres inyecciones volumétricas en el mismo hemisferio con trazadores

fluorescentes que tuvieran distinto espectro de emisión para asegurar que fueran visualmente distinguibles durante su análisis, con el fin de reducir el número de animales utilizados.

Inicialmente, empleamos los trazadores Fast-Blue (FB al 0,1% en tampón cacodilato 0,1M a pH 7,3; diamidino compound 253/50, Polysciences Inc., Warrington, Pensilvania, EE.UU.) y Fluorogold (FG al 0,75% en tampón fosfato (PB) 0,1M a pH 7,4; methanesulfonato de hydroxystilbamidina, Fluorochromes, Denver, Colorado, EE.UU.). Estos compuestos inorgánicos tienen la particularidad de ser endocitados por terminales nerviosas y por neuritas dañadas donde son incorporados en vesículas y transportados retrógradamente hasta el soma neuronal (Bentivoglio et al. 1980). Por lo que un aspecto a tener en cuenta es la concentración usada para su captación y transporte, ya que pueden producir un grado variable de necrosis tisular focal en el punto donde son depositados, aunque esto no afecte en su transporte vesicular posterior. Concretamente, FB marca el citoplasma y el inicio de las dendritas (Bentivoglio et al. 1980) y FG el núcleo, citoplasma y dendritas (Schmued y Fallon 1986).

Pero estas moléculas no nos permitían realizar depósitos lo suficientemente limitados porque suelen presentar un halo de dispersión del trazador alrededor del área efectiva del depósito que entorpece su delimitación precisa y necrosis de las células en contacto con la pipeta. Es por esto que comenzamos a usar otro tipo de trazadores fluorescentes, como la subunidad B de la toxina colérica de *Vibrio cholerae* (CTB) conjugada con diversos fluorocromos de la familia Alexa Fluor® cromáticamente distinguibles por sus alejados espectros de emisión: CTB-A594 y CTB-A488 (diluidas al 0,1% en PB 0,1M a pH 7,3; Life Technologies, Carlsbad, California, EE.UU.) (Conte et al. 2009). El marcado neuronal de éstos últimos se produce a través de su entrada por la unión de la CTB a receptores específicos de membrana (Wan et al. 1982; Wu et al. 2003) y se transportan en vesículas hasta el soma, donde marcan el citoplasma (Conte et al. 2009). Las CTB-Alexas son moléculas muy neurótropas que permiten una estimación más acertada del área efectiva del depósito.

Por otro lado, también se empleó como trazador la subunidad B de la toxina colérica libre (CTB al 0,1% en tampón Tris 0,05M; Sigma-Aldrich, San Luis, EE. UU.), la cual observamos que poseía varias desventajas. Una de ellas es que no permite la visualización directa del trazador tras cortar el tejido, al no tener un fluorocromo asociado, sino que mediante técnicas inmunohistoquímicas hay que añadirle una molécula fluorescente, lo que alarga el procesamiento y análisis del tejido. Otra desventaja que nos llevó a descartar este trazador es que el transporte de la molécula es demasiado rápido y, tras el tiempo de espera requerido para

que el trazador alcance todos los cuerpos neuronales, es imposible determinar la posición y extensión del depósito porque la molécula se ha abandonado el lugar de inyección. Esto contribuye a que se desconozca si un aumento en la cantidad de somas retrógradamente marcados tras el depósito de este trazador es debido a su mayor eficiencia de transporte o simplemente a una mayor extensión del depósito en la corteza, lo que no nos permitía tampoco utilizar más de un trazador retrógrado en un mismo animal (Wu et al. 2003).

En las cirugías para la aplicación de este tipo de trazadores (n=51) se tomaron las coordenadas estereotáxicas del atlas de Franklin y Paxinos (2008). Así, como punto de referencia para la coordenada ML se tomó bregma, para la coordenada AP el seno transversal y para la dorsoventral (DV) la superficie pial. Así los depósitos en V1 se realizaron en los niveles de AP, ML indicados en la Tabla 1 y DV en forma columnar a tres alturas 0,6/0,4/0,2mm, las coordenadas de los depósitos de las distintas cortezas extraestriadas LM, LI, P, AL, RL, A, AM, PM, MM y POR se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Coordenadas estereotáxicas empleadas para realización de los depósitos columnares de trazadores retrógrados en las cortezas visuales estriada y extraestriada. Ver lista de abreviaturas.

	AP (mm)	ML (mm)	DV (mm)
V1	+0,9 y +1,3	+2 y +2,8	0,6-0,4-0,2
LM	+1,4	+4,1	0,6-0,4-0,2
LI	+1,45	+4,2	0,6-0,4-0,2
P	+1,0	+4,2	0,6-0,4-0,2
AL	+2,4	+3,7	0,6-0,4-0,2
RL	+2,8	+3,3	0,6-0,4-0,2
A	+3,4	+3,5	0,6-0,4-0,2
AM	+3	+1,7	0,6-0,4-0,2
PM	+1,9	+1,6	0,6-0,4-0,2
MM	+2,5	+1,2	0,6-0,4-0,2
POR	+1,15	+4,3	0,6-0,4-0,2

Por último, se realizaron algunas inyecciones en regiones circundantes a las cortezas visuales asociativas para descartar contaminación en estas áreas de depósitos que se localizaban parcialmente en áreas extraestriadas, en estos casos se tomó la coordenada anteroposterior tomando como referencia bregma. Algunas son cortezas parietales medial y lateral, y posterior rostral, así como en la corteza retroesplenial caudal, la temporal anterior y la ectorrinal, cuyos

parámetros de inyección se indican en la Tabla 2. Con el fin de delimitar con mayor precisión las distintas áreas corticales visuales extraestriadas a través de sus conexiones callosas, en 3 animales se realizaron una serie de perforaciones estrechas y alargadas en el cráneo separadas por aproximadamente 0,8mm cubriendo hasta el polo temporal y paralelas a la sutura sagital donde se efectuaron inyecciones extensas columnares de FB al 1% en toda su longitud. Estas perforaciones se extendían en el eje AP desde la corteza frontal hasta la occipital con la finalidad de cubrir todo el hemisferio. Fijamos un periodo de supervivencia de 4 días.

Tabla 2. Coordenadas estereotáxicas empleadas para realización de los depósitos columnares de trazadores retrógrados en las áreas corticales limitantes con las cortezas visuales en el ratón. Ver lista de abreviaturas.

	AP (mm)	ML (mm)	DV (mm)
MPtA/ LPtA	-1,9	+1,3	0,6-0,4-0,2
PPtR	-2,6	+3,5	0,6-0,4-0,2
RSD	-2,8	+0,7	0,6-0,4-0,2
TeA	-3,9	+3,9	0,6-0,4-0,2
Ect	-1,7	+4,0	0,6-0,4-0,2

La aplicación de los trazadores retrógrados ha sido en todos los experimentos mediante inyección por presión. Pero hasta poner a punto un protocolo de marcado óptimo produciendo depósitos lo bastante pequeños con buen transporte, utilizamos dos tipos de inyectores.

Comenzamos usando el Picospritzer II (General Valve Corporation, Fairfield, Nueva Jersey, EE.UU.). Este inyector requiere de pipetas de borosilicato con un capilar de vidrio (FHC, Bowdoin, Maine, EE.UU.) que fueron estiradas mediante un estirador de pipetas vertical (Modelo 700c, David Kopf; Tujunga, California, EE.UU.) de forma que el diámetro de los primeros 5mm de pipeta fuese inferior a 100µm, para evitar dañar en exceso la corteza cerebral durante su descenso, especialmente la superficie cortical. Ajustamos el poro del extremo de la pipeta a un diámetro determinado para cada experimento en función de la densidad del trazador utilizado, entre 10 – 25µm (10-15µm para CTB-Alexas y CTB libre, 15-25µm para FB y FG), cortando este bajo lupa utilizando un bisturí. El tamaño del poro se comprobó en un microscopio óptico Nikon Eclipse E600 (Nikon, Tokio, Japón) que tenía acoplada una cámara digital (Nikon DMX1200, Tokio, Japón), bajo un objetivo de 40x y utilizando las herramientas de medida del software NIS-Elements® BR 3.2 (Nikon, Tokio, Japón). Las pipetas se rellenaron con el trazador deseado por capilaridad poniendo en contacto con la solución su extremo grueso cuidando de que no queden burbujas en la punta, y se acopló al vástago, conectado a la electroválvula del Picospritzer, sujeto

a una torre estereotáxica. Al posicionar la punta de la pipeta en la coordenada de interés inyectamos un volumen entre 0,01µl – 0,1µl del trazador mediante sucesivos pulsos de presión de 0,5 bares durante 10 – 20ms.

Mediante este procedimiento no era posible producir depósitos restringidos a las pequeñas áreas corticales visuales extraestriadas, por lo que buscamos un aparato en el que la cantidad de volumen inyectado fuera mucho menor y en condiciones más controladas. El inyector automático Nanoject II (Drummond Scientific Company, Broomal, Pensilvania, EE.UU.) permite rangos de volumen desde 2,3nl a 69nl en cada pulso, lo que lo convierte en un método más óptimo para este fin. Este aparato requiere de pipetas de un tamaño preciso y sin capilar de vidrio en su interior, ya que en este caso el trazador de carga por succión gracias a la resistencia que presenta un aceite mineral con el que se rellena la pipeta previamente. Es muy importante también no romper el extremo romo de la pipeta para que el mecanismo de succión funcione. Así el vástago del Nanoject se une a la torre estereotáxica para inyectar el volumen de trazador de forma controlada, en nuestro caso mediante 5 sucesivos pulsos de presión administrando 4,6nl cada uno, es decir, 23nl en total. Esto nos permite no causar tanto daño en el tejido en el lugar del depósito.

En todos los casos, dejamos entre 5 y 10 minutos de reposo de la pipeta en el interior del tejido para evitar reflujo y contaminación a otras áreas. Los tiempos de supervivencia para los experimentos de trazado retrógrado fueron de 7 días a excepción de en los que se utilizó CTB libre, que fueron de 5 días.

2.2 Experimentos de trazado anterógrado

Tras delimitar precisamente los núcleos y subnúcleos talámicos que proyectaban a V1 y las distintas áreas visuales extraestriadas gracias a las inyecciones retrógradas y diversas tinciones histológicas e inmunohistoquímicas. El siguiente paso era realizar microdepósitos de un trazador anterógrado en estos núcleos talámicos (dLGN, LPL, LPMC, LPMR) con el fin de realizar un estudio detallado y sistemático de la distribución areal y laminar de sus proyecciones.

2.2.1 Realización de microdepósitos de BDA

En los primeros experimentos de trazado anterógrado (n= 45) se utilizó como trazador BDA de 10KDa al 3% en PB 0,01M a pH 7,4 (10000-lysine fixable, Life Technologies, Carlsbad, California, EE.UU.). Este trazador se transporta de forma anterógrada fundamentalmente y

produce un relleno del árbol axónico bastante bueno y de sus terminales cuando es aplicado mediante iontoforesis (Reiner et al. 2000). Las pipetas utilizadas fueron las mismas que en los experimentos de trazado retrógrado con FB y FG, pipetas de borosilicato con un capilar de vidrio que permite cargar el trazador por capilaridad y diámetro de poro en la punta de entre 3 y 5 μm . Una vez emplazada la punta en las coordenadas estereotáticas del dLGN, LPL, LPMC y LPMR (indicadas en la Tabla 3) obtenidas del Atlas de ratón de Franklin y Paxinos (2008), tomamos como referencia la coordenada de bregma. Se introdujo un electrodo de plata en la pipeta para permitir el paso de corriente y se aplicaron pulsos sucesivos de corriente positiva de 50-200 nA durante 40-50 minutos en ciclos 1 segundo on/off utilizando el microinyector PS-100 (Microiontophoresis Dual Current 260, World Precision Instruments, WPI, Sarasota, Florida, EE.UU.). La corriente fluía a través de dos electrodos, uno conectado a la piel del animal y otro a una fuente de corriente, permitiendo así que salieran las moléculas cargadas negativamente del trazador, tomando como modelo un protocolo de aplicación previamente descrito (Pinault 1996; Frangeul et al. 2014). Al finalizar la inyección se mantuvo la pipeta en reposo durante 10-12 minutos para evitar la contaminación de otras áreas en su ascenso o dañar el tejido en su trayectoria de salida. El procedimiento se repitió bilateralmente en el otro tálamo del animal, para reducir el número de animales utilizados. Tras la intervención, los animales se mantuvieron en el animalario durante 7 días hasta su sacrificio.

Tabla 3. Coordenadas estereotáticas empleadas para realización de los depósitos bilaterales de trazadores anterógrados en los núcleos del tálamo visual. Ver lista de abreviaturas.

	AP (mm)	ML (mm)	DV (mm)
dLGN	-2,5	$\pm 2,3$	-2,3
LPL	-2,2	$\pm 2,0$	-2,3
LPMC	-2,4	$\pm 2,0$	-2,3
LPMR	-1,8	$\pm 1,1$	-2,3

2.2.2 Realización de microdepósitos mediante la inyección de pseudoviriones de vectores virales.

Debido al tipo de proyecciones de algunos núcleos del complejo LP tan extensas e intrincadas, tras la amplificación y revelado del trazador BDA, los terminales axónicos en regiones corticales más distales mostraban un marcado incompleto. Esto nos llevó a buscar un vector viral que permitiera un trazado rápido y completo de axones complejos y extensamente ramificados,

y que permitiera, como en el caso del BDA, su amplificación y revelado para su posterior análisis cualitativo y cuantitativo (Figura 58). Escogimos el vector viral DNA adeno-asociado AAV2/1.hSyn.eGFP.WPRE.hGH (Penn Vector Core, Universidad de Pensilvania, Pensilvania, EE.UU.), un serotipo altamente neurótrofo (Gao et al. 2005). Los AAV forman parte del género *Dependovirus* pertenecientes a la familia *Parvoviridae* y poseen un genoma de ADN monohebra de aproximadamente 4,7kb (Atchinson et al. 1965; Gao et al. 2004; Castle et al. 2014). Estos vectores mantienen sólo un 6% del genoma original del virus adeno-asociado y se nombran en base al tipo de vector viral seguido del serotipo de la cápside, el promotor, el transgen y la señal de poliadenilación. En este caso, el vector AAV utilizado codifica la secuencia de una versión modificada potenciadora de la proteína fluorescente verde (eGFP) bajo la regulación del promotor de sinapsina humana que restringe la expresión del vector a únicamente neuronas, como transgen contiene el elemento regulador post-transcripcional del virus de la hepatitis de la marmota que posee una muy elevada eficacia de expresión, y como señal de poliadenilación la hormona del crecimiento bovina que contribuye a la estabilización del mRNA (Wang et al. 2014). Como casi todos los serotipos de AAV presentan un transporte tanto anterógrado como retrógrado, tan sólo el serotipo 8 tiene mayor preferencia por su transporte anterógradamente, pero es característico sólo del serotipo 1 su posibilidad de transportarse y traducirse a largas distancias y a gran velocidad desde el lugar de inyección en células postmitóticas (Castle et al. 2014), por ello elegimos éste. Los somas próximos al poro de la pipeta van a capturar activamente los viriones mediante un receptor específico del serotipo y se van a transportar de forma endosomal intracelularmente hasta el terminal (Castle et al. 2014). De esta forma el vector viral permanece en la célula de forma episomal en el citoplasma, con una frecuencia mínima de integración, y traduciéndose constantemente (Choi et al. 2014). Así los vectores AAV presentan como principales ventajas su eficacia en transporte y transducción rellenando completamente los ramificados campos terminales de las neuronas de proyección, su largo tiempo de persistencia de expresión del transgen y la mínima toxicidad para la neurona que lo endocita (Peel y Klein 2000), que se mantiene viva durante el periodo de supervivencia del animal de 5 semanas.

El método detallado para su aplicación mediante inyección iontoforética aparece publicado de forma conjunta con el atlas de conectividad del Allen Institute for Brain Science (Harris et al. 2012; Oh et al. 2014). En nuestro caso (n= 33), comenzamos utilizando los parámetros de inyección iontoforética descritos previamente (Oh et al. 2014) con la titulación original del vector de $2,87 \cdot 10^{10}$ copias del genoma por mililitro (GC/ml) pero reduciendo la intensidad de corriente aplicada (Tabla 4, Pr1). Estas inyecciones bilaterales se realizaron en dLGN, LPL, LPMC, LPMR y

en el colículo superior (SC) (tomando las coordenadas AP +4,1mm, ML +1,1mm y DV -0,8mm). Así, tras la toma mediante estereotaxia de las coordenadas diana, se introdujo la pipeta de borosilicato de aproximadamente 20µm de diámetro de la punta, cargada por capilaridad con la solución de 10^{10} de pseudoviriones y con un electrodo de plata en su interior que estaba conectado a una fuente de corriente y al microinyector PS-100. Y se aplicaron pulsos de corriente negativa de 500nA durante 1 minuto en ciclos 7 segundos on/off. Al ver la alta tasa de infectividad a esa concentración, diluímos el vector viral en buffer fosfato-salino plus 1x (DPBS; gibco®, Life Technologies™, Madrid, España) sucesivamente para comprobar cuál era la mínima concentración de copias genómicas del vector para producir una infección efectiva de las células diana. Comprobamos que 10^8 CG/ml marcaba el límite inferior, a concentraciones más bajas no se observaba ninguna neurona marcada. Después probamos varias combinaciones de parámetros eléctricos de intensidad de corriente, tiempo de inyección y diámetro interno de pipeta, cada vez más cercanas a las de las microinyecciones de BDA (Pinault 1996; Reiner et al. 2000) hasta conseguir reducir el número de células infectadas a micropoblaciones de entre 5 y 15 neuronas marcadas visualmente distinguibles (Figura 59).

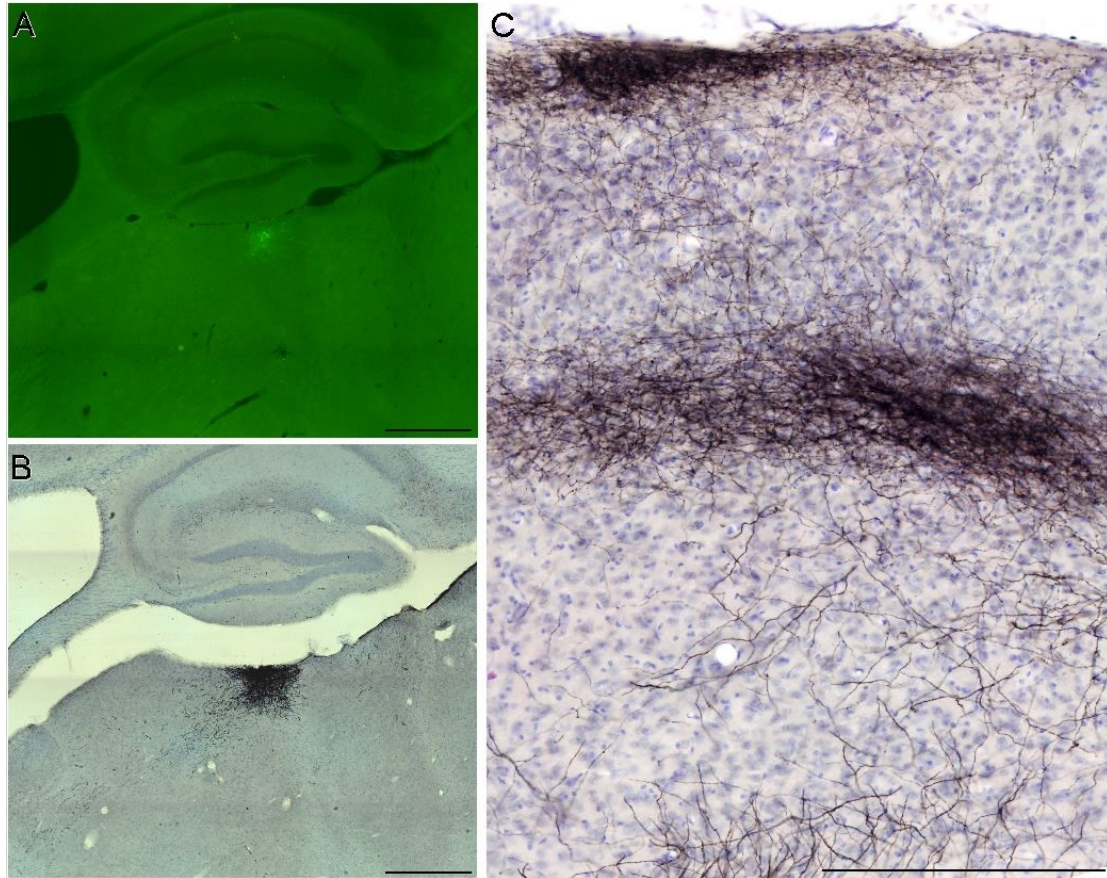


Figura 58. Experimentos de trazado utilizando el vector viral AAV-GFP. (A,B) Microfotografías de secciones sagitales talámicas donde se observan las poblaciones neuronales marcadas con GFP del vector AAV en fluorescencia y tras su revelado con DAB-Níquel, en los primeros experimentos durante la puesta a punto del método de trazado axonal. (C) Microfotografía del detalle en el marcado axónico de las neuronas TC en V1/LM. Barras de calibración de 500 μ m (A, B) y 100 μ m (C).

Una vez terminada la inyección esperamos 10 minutos antes de extraer la pipeta y suturamos al animal como aparece detallado en apartados anteriores. Por último, el tiempo de supervivencia estimado en los experimentos de transfección con este vector y conseguir un trazado óptimo está en torno a las 5 semanas.

Tabla 4. Protocolos experimentales usados para el marcado de micropoblaciones de neuronas con pseudoviriones de AAV mediante microiontoforesis.

Protocolo	Dilución (GC/ml)	Ø interno pipeta (μ m)	Intensidad (nA)	Tiempo inyección (min)	Nº neuronas marcadas	Nº casos con éxito
Pr1	10^{10}	10-20	500	1	>100	4
Pr2	10^9	10-20	400	30	>100	2
Pr3	10^8	10-20	700	10	>100	2
Pr4	10^7	10-20	700	10	0	0
Pr5	10^5	10-20	700	10	0	0
Pr6	10^3	10-20	700	10	0	0
Pr7	10^8	10-20	400-500	20-30	>30	9
Pr8	10^8	7-12	300-350	30-40	5-15	11
Pr9	10^8	7	250	40	1	1

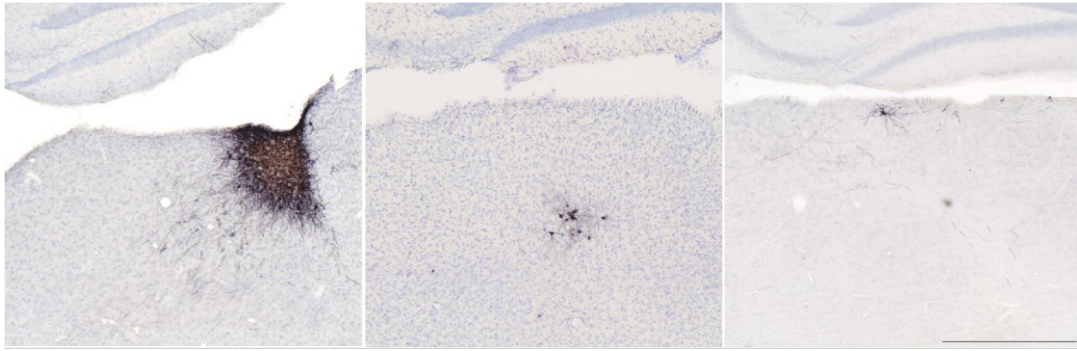


Figura 59. Microfotografías de secciones sagitales talámicas mostrando los distintos tamaños de micropoblaciones marcadas durante la puesta a punto del método de marcado axónico mediante el vector AAV-GFP. Barra de calibración de 500 μ m.

3 EXPERIMENTOS DE TRAZADO DE NEURONA ÚNICA

Una vez analizada en detalle las diferentes arquitecturas de los axones tálamo-corticales de conjuntos de unos pocos somas neuronales pertenecientes al dLGN y el complejo LP, nos planteamos comparar si el comportamiento de una neurona única era muy similar al observado en una población de neuronas adyacentes. Para conseguir el marcado de una única neurona tálamo-cortical de larga proyección, en muchos casos con un axón que se va a ramificar profusamente tanto tangencialmente alcanzando múltiples áreas corticales muy alejadas entre sí como radialmente ascendiendo y dejando terminales en varias capas de éstas cortezas, se necesita un método de marcado que asegure el relleno completo de la célula diana. Para ello, la mejor herramienta son los vectores virales con alta eficacia replicativa y que permiten la expresión un marcador fluorescente reportero que permita su identificación rápidamente. Es por ello que comenzamos utilizando el vector viral adeno-asociado AAV2/1.hSyn.eGFP.WPRE.hGH, explicado en el apartado anterior, aunque su eficiencia para la infección de una sola neurona era muy baja, y pasamos a usar el vector viral RNA Sindbis-pal eGFP (CREST, Universidad de Kyoto, Japón). Este vector fue desarrollado y cedido a nuestro laboratorio por el grupo del doctor Takeshi Kaneko, asociado a la Universidad de Kyoto y el centro CREST en Japón.

3.1 Marcado de neuronas aisladas mediante la inyección de pseudoviriones SindBis

Finalmente, el método escogido para los experimentos de marcaje de célula única fue la transfección *in vivo* con pseudoviriones Sindbis-pal-eGFP a diluciones muy bajas, produciendo un trazado rápido y completo de estos axones complejos. El virus Sindbis pertenece al género alfavirus de la familia de los togavirus (Griffin 1998; Furuta et al. 2001), y en su papel como vector, está modificado para producir una replicación defectuosa, presentando varias ventajas como su elevada eficacia infectiva en células adultas y elevada eficacia transduccional del gen reportero que transportan. El genoma de este vector viral está compuesto por una sola hebra de RNA que trasporta y expresa como gen reportero una versión modificada de la proteína verde fluorescente de *Aqueoria victoria* facilitadora de su traducción (eGFP) fusionada con la señal de palmitoilación de GAP43 (Furuta et al. 2001). Esta última secuencia de palmitoilación adyacente al eGFP va a redireccionar constantemente a la proteína reportera hacia la proteína de membrana celular GAP43 hasta rellenarla por completo en toda su longitud para su visualización (Tamamaki et al. 2000).

La generación de los pseudoviriones Sindbis-pal-eGFP se realizó a partir de los dos plásmidos recibidos (el vector Sindbis-pal-eGFP y un plásmido codificante para las proteínas estructurales de la cápside DH-26S) en el laboratorio de vectores en el departamento de terapia génica y hepatología del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA, Universidad de Navarra, España).

El método de inyección de estos pseudoviriones fue por presión utilizando el Picospritzer II (General Valve Corporation, Fairfield, Nueva Jersey, EE.UU.) (n= 10). Tras la anestesia, colocación del animal en el aparato estereotáxico y la realización de una pequeña craneotomía, se introdujo a través de la superficie cortical hasta las coordenadas de dLGN, LPL, LPMC o LPMR la micropipeta de borosilicato de 20 μm de poro cargada por capilaridad con una dilución de $1/3$ de 10^6 partículas virales/ml en PBS al 0,05% a pH 7,4 y albúmina de suero bovino (BSA) al 0.5%. Inyectamos un volumen de solución viral aproximado de 0,03-0,06 μl , que contenía aproximadamente entre 10 y 100 partículas infectantes, mediante sucesivos pulsos de presión de 10 ms de duración con una presión de entre 0,5 y 0,75 bares conectado a una electroválvula. Tras la inyección se mantuvo 10 minutos la pipeta en el punto de inyección para evitar un gran desplazamiento de estas partículas virales en el espacio intersticial, y se suturó la piel. Para este tipo de experimentos de transfección con Sindbis se les dio a los animales un tiempo de supervivencia de entre 48 y 60 horas para asegurar el relleno completo con GFP de las neuronas

de proyección, pero sin comprometer la supervivencia de la célula ya que se ha descrito que tras 72 horas se produce la muerte neuronal (Kim et al. 2004). Se ha comprobado que al alargar el periodo de supervivencia, las neuronas muestran cambios degenerativos como dendritas arrosariadas y cuerpos celulares contraídos (Figura 60), hasta desaparecer la inmunoreactividad del GFP por completo tras 28 días (Furuta et al. 2001).

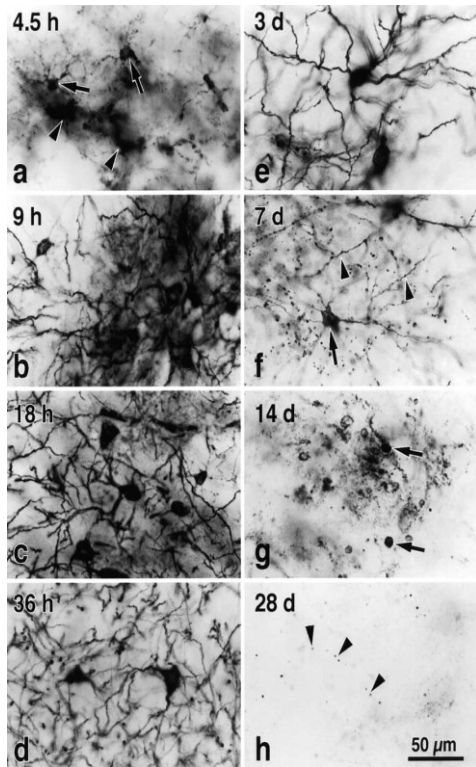


Figura 60. Evolución de la inmunorreactividad frente al palGFP tras la inyección del vector viral Sindbis en el núcleo talámico ventrobasal de la rata desde las 4,5 horas (a) hasta los 28 días (h). Tomado de Furuta et al. (2001).

3.2 Marcado de neuronas aisladas mediante electroporación *in vivo* de RNA del vector viral SindBis

En los últimos años, nuestro grupo ha desarrollado un nuevo método más eficiente de marcado de células únicas (Porrero, Rodríguez-Moreno, Quetglas, et al. 2016) que permite transferir *in vivo* el RNA del vector Sindbis-pal-eGFP directamente a la neurona en contacto con el poro de la pipeta y así disminuir al mínimo la posibilidad del pseudovirión de desplazarse por el líquido intersticial, infectando células en regiones alejadas. Hasta ese momento, este método de inyección *in vivo* mediante presión seguida de un choque electrosmótico con el fin de permeabilizar durante un breve periodo de tiempo la membrana celular y promover así el paso del material genético contenido en la solución, se había utilizado introduciendo DNA en animales prenatales, postnatales y adultos con la finalidad de marcar grupos neuronales (revisado por De Vry et al. 2010; Nomura et al. 2016). También algunos grupos han llevado a cabo este tipo de técnica en roedores con la finalidad de marcar una única célula guiados

visualmente, tanto de forma directa *ex vivo* en cultivos celulares u organotípicos (Hanzel et al. 2015) como de forma indirecta *in vivo* utilizando un microscopio de doble fotón, o guiados mediante registro electrofisiológico extracelular (Kitamura et al. 2008; Marshel et al. 2010) o registro de patch-clam de célula entera con el DNA plasmídico disuelto en solución intracelular (Rancz et al. 2011) limitado siempre a estructuras superficiales encefálicas como las capas corticales más superficiales.

Nuestros experimentos de electroporación *in vivo* de RNA monohebra del vector Sindbis-pal-eGPF (n= 28) se realizaron con la finalidad de marcar neuronas de proyección talamo-cortical situadas en los núcleos dLGN, LPL, LPMR y LPMC, por lo tanto una estructura profunda con el tálamo y sin posibilidad de guía visual. La amplificación en forma plasmídica, transcripción, linearización y purificación hasta producir una solución de RNA apto para electroporar, recibido en alícuotas de 5µl a una concentración de 1,8-2µg/µl, fue realizado al igual que los pseudoviriones Sindbis en el laboratorio de vectores en el departamento de terapia génica y hepatología del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA, Universidad de Navarra, España).

Previamente a la realización del experimento, las micropipetas de borosilicato con un capilar de vidrio en su interior estiradas y cortadas hasta conseguir un diámetro de punta entre 20 y 30µm fueron colocadas junto el material quirúrgico que íbamos a utilizar durante toda la noche en una estufa a 250°C para así eliminar la actividad RNAasa. De igual forma, antes de realizar la cirugía se esterilizaron los viales donde íbamos a resuspender la solución de RNA y las puntas de pipeta en autoclave a 115°C durante 60 minutos y se limpiaron todas las superficies del quirófano con una solución de agua destilada con peróxido de hidrógeno al 2%. De igual forma, durante el resto de la intervención se tomaron medidas para evitar la contaminación de la muestra como el uso de doble guante estéril, mascarilla quirúrgica y gafas protectoras. Iniciamos las operación colocando al animal en el marco estereotáxico como previamente se ha descrito y llevando a cabo una pequeña craneotomía, la superficie cortical fue cubierta con suficiente volumen de solución salina para impedir su desecación y consecuente deterioro de las capas corticales superficiales. Sucesivamente, se descongeló paulatinamente en un recipiente con hielo un vial de RNA que se había mantenido congelado a -80°C desde su recepción, y al que se había añadido en condiciones estériles en el interior de una campana de flujo laminar 0,6µl de cloruro sódico (NaCl) 5M en agua destilada con dietilpirocarbonato (DEPC) para eliminar RNAasas y aumentar la eficacia de la electroporación mediante choque electrosmótico, así como reducir la resistencia al paso de corriente en la punta de la pipeta (Lee et al. 2002). En el mismo recipiente con hielo cargamos en la micropipeta estéril por capilaridad la solución de RNA y la

colocamos en el vástago unido a la torre estereotáxica. Este vástago diseñado especialmente para este fin, contiene un electrodo en su interior que estaba en contacto con la solución que actúa como terminal negativo del inyector de corriente (Units ION100-T y PS-100; Microiontophoresis Dual Current 260, World Precision Instruments, WPI, Sarasota, Florida, EE.UU.), y posee también una salida a la que se enrosca un tubo unido a un inyector de presión (Picospritzer II). El electrodo positivo se colocó sobre la superficie craneal lo más cercano posible al otro (Figura 61). Este paso hay que realizarlo con extrema rapidez ya que el RNA precipita rápidamente, bloqueando su salida de la pipeta durante la inyección por presión. Se inyectó por presión un pequeño volumen de entre 50 y 100 nl, e inmediatamente después se le aplicaron dos trenes de pulsos cuadrados muy cortos de 1ms de 50V de corriente a frecuencias muy altas (200Hz) durante un tiempo total de 1s (Porrero, Rodríguez-Moreno, Quetglas, et al. 2016). De esta forma la célula electroporada no sufría lesiones relevantes.

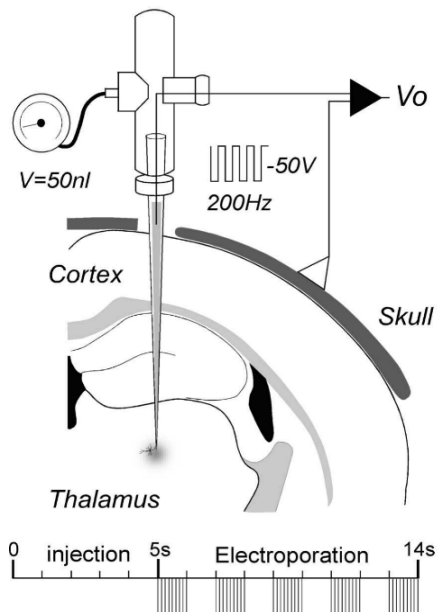


Figura 61. Esquema del método de aplicación en un núcleo talámico de la monohebra de RNA procedente del vector viral Sindbis-pal-eGFP mediante electroporación *in vivo*. Tomado de Porrero et al. (2016).

Se mantuvo la pipeta durante 10 minutos para evitar mayores daños físicos sobre la neurona electroporada, y contaminación en otras áreas, ya que en la bibliografía se describen casos de entrada de DNA en las células únicamente por choque osmótico (Lee et al. 2002). Como en el caso de los pseudoviriones de Sindbis el periodo de supervivencia de los animales fue entre 56 y 64 horas.

3.3 Marcado de neuronas aisladas mediante electroporación *in vivo* de DNA del vector viral AAV

Debido a que el método de electroporación *in vivo* de RNA perteneciente al vector Sindbis-pal-eGFP no tenía una eficiencia muy alta, probamos a realizar un experimento similar usando los mismos parámetros e indicaciones de esterilidad que en el caso de la electroporación de RNA, anteriormente descrita, pero esta vez introduciendo el DNA plasmídico pAAV.hSynap.eGFP.WPRE.bGH del vector adeno-asociado AAV2/1.hSyn.eGFP.WPRE.hGH usado previamente en experimentos de marcado poblacional (n= 15). Estos plásmidos fueron adquiridos en el servicio de Penn Vector Core de la Universidad de Pensilvania (Pensilvania, EE.UU.) en viales de 20µl a una concentración de 2,15µg/µl conservados a -80°C.

Consideramos mantener los mismos parámetros de inyección volumétrica seguida de estimulación eléctrica que en la electroporación de RNA, ya que durante la búsqueda bibliográfica para poner a punto este método de marcado de célula única la mayoría de artículos relacionados estaban referidos a la inyección de DNA plasmídico usando los mismos parámetros eléctricos (Kitamura et al. 2008; De Vry et al. 2010; Nomura et al. 2016) y de concentración de la sales en la solución de DNA (Lee et al. 2002). Así tras colocar en el marco estereotáxico al animal y realizar una pequeña craneotomía cubriéndola con solución salina, se rellenaron las pipetas de borosilicato de entre 15 y 20µm con solución del plásmido con 0,6µl de NaCl-agua destilada-DEPC 5M por capilaridad y se sujetó al vástago, unido a la torre estereotáxica, con un electrodo negativo en su interior en contacto con la solución a inyectar. El electrodo positivo se encontraba próximo sobre la superficie del cráneo, y ambos estaban conectados al inyector de corriente (PS-100) mediante el que se administraron dos o tres trenes de pulsos cuadrados muy cortos de 1ms de 50V de corriente a frecuencias muy altas de 200Hz durante un tiempo total de 1 s, posteriormente a la aplicación mediante un inyector de presión (Picospritzer II) de un pequeño volumen de DNA en entre 2 y 3 pulsos de presión de 10ms de duración a entre 0,5 y 0,75 bares de presión. Tras la liberación de la solución con distinta carga osmótica en el espacio extracelular y la aplicación de la corriente en uno de los núcleos talámicos diana de nuestro estudio (dLGN, LPL, LPMR o LPMC), se mantuvo 10 minutos para disminuir la probabilidad de contaminación a otras áreas. Después se extrajo y se suturó al animal, el cual se sacrificó a las 4-6 semanas. Inicialmente, este método plateaba múltiples ventajas en cuanto a la electroporación de RNA, ya que el DNA es una molécula más estable al ser circular y más difícil de destruir, por lo que la eficiencia de este método se debería ver incrementada. Sin embargo, durante la puesta a punto del método no obtuvimos muchas neuronas en buen estado y con un marcado óptimo,

lo que unido a los largos tiempos de espera, no presentaba verdaderas ventajas sobre la electroporación de RNA.

4 SACRIFICIO Y PERFUSIÓN

Transcurrido un tiempo de supervivencia suficiente que permitiera el transporte axónico completo de cada uno de los trazadores utilizados (entre 56 horas y 5 semanas dependiendo del trazador utilizado), los animales fueron anestesiados intraperitonealmente con dosis letal de pentobarbital sódico (80mg/kg; Dolethal®, Vetoquinol, Madrid, España). Al comprobar que el animal no mostraba reflejos ante estímulos dolorosos, se realizó una incisión en la cavidad abdominal por la línea media, se cortó el diafragma y la cavidad torácica, para dejar expuesto el corazón. Se retiró el pericardio y se introdujo en el ventrículo izquierdo una aguja hipodérmica con borde romo acoplada a una bomba peristáltica de flujo graduable (MasterFlex®, Cole-Parmer, Vernon Hills, Illinois, EE.UU.). Los animales fueron perfundidos intraventricularmente con 30 ml de suero salino heparinizado para retirar toda la sangre del sistema vascular. Inmediatamente después se perfundieron 120ml de una solución fijadora de paraformaldehído (PFA) al 4% en PB 0,1M a pH 7,4.

Tras pasar la solución fijadora, se decapitó a los animales y se extrajo el encéfalo con ayuda de un bisturí, y unas pinzas hemostáticas. Después se post-fijaron los cerebros mediante inmersión durante 24 horas en PFA 4% a 4°C. Transcurrido este tiempo, los encéfalos extraídos se crioprotegieron 48 horas más en una solución de sacarosa al 30% en PB 0,1M a 4°C que se hundieron.

5 PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO

5.1 Corte seriado del tejido

La crioprotección en sacarosa al 30% tenía como finalidad proteger la integridad del tejido al cortarlo con un microtomo de deslizamiento acoplado a una unidad de congelación (Leica SM2400; Leica Microsystems AG, Wetzlar, Alemania) en secciones sagitales de 50µm de grosor.

Previamente, los cerebros crioprotegidos habían sido bloqueados en el plano coronal con una cuchilla para separar el tronco del encéfalo y los bulbos olfatorios del resto del encéfalo y así facilitar su corte. Así, los encéfalos se pegaron a la unidad de deslizamiento del micrótopo sobre una plataforma de sacarosa al 30%, una mínima cantidad de Tissue-Tek (Sakura Finetek Europe, Alphen, Holanda) que favorezca su adhesión inicial y cubriéndolo hasta taparlo de sacarosa al 30% para estabilizar el bloque de encéfalo durante el corte. Estas secciones fueron recogidas de forma seriada en cajas multipocillo con una solución de PB 0,1M frío. En los casos de experimentos con trazadores fluorescentes como retrógrados fluorescentes o asociados a fluorocromos (FB, FG y CTB unidos a Alexa Fluor®), de inyección de pseudoviriones (AAV y Sindbis) y de electroporación de DNA o RNA, se observaron directamente con la ayuda de un microscopio óptico de epifluorescencia (Nikon Eclipse E600, Tokio, Japón) para determinar el tamaño y la localización del depósito de trazador en algunos casos, y en otros la existencia o no de células únicas marcadas, con la ayuda del Atlas de ratón de Franklin y Paxinos (2008).

5.2 Experimentos de trazado retrógrado

En el caso de los trazadores retrógrados mencionados en el párrafo anterior, se realizaron dos series y una de ellas se montó inmediatamente para la visualización del trazador neuronal. Para ello, se trasladaron las secciones de forma ordenada a una placa de Petri con PB 0,03M y desde ahí se extendieron con la ayuda de un pincel sobre portaobjetos gelatinizados (Menzel-Glaser®, Menzel GmbH, Brunswick, Alemania) rotulados con un lápiz de diamante para su identificación y se dejaron secar 24 horas en oscuridad, para reducir el fotoblanqueamiento de la fluorescencia del tejido, y cubiertos con papel de aluminio para evitar la entrada de polvo. Transcurrido este periodo de tiempo, en una cesta de vidrio fueron deshidratadas en pases de alcoholes ascendentes (70°, 80°, 90° y 100°) de 15 segundos, y desengrasadas en xileno (Panreac, Barcelona, España) durante 30 minutos. Sucesivamente, fueron cubiertas con un cubreobjetos de cristal utilizando como medio de montaje DePeX® (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Alemania).

5.2.1 Tinción histoquímica para detectar la actividad de la enzima citocromo oxidasa (CyO)

La segunda serie recogida de forma seriada en las placas segunda serie fue procesada mediante una tinción histológica, en este caso para revelar la actividad de la citocromo oxidasa

según el protocolo de Wong-Riley (1979). Esta enzima forma parte de la cadena respiratoria de las crestas mitocondriales y su actividad se usa como un marcador de la actividad metabólica neuronal. Es una tinción muy utilizada ya que esta enzima capaz de oxidar al citocromo C desprendiendo un radical de oxígeno que en este caso se utiliza para oxidar al DAB y que se forme un precipitado marrón insoluble. Es por esto que utilizamos esta tinción junto a muchas otras para la delimitación citoarquitectónica de nuestro núcleos talámicos diana (dLGN, LPL, LPMC, LPMR), así como de la corteza visual primaria (V1) y las cortezas visuales extraestriadas circundantes.

El revelado de esta actividad enzimática empieza sumergiendo las secciones ordenadas en la placa multipocillo en la solución de incubación que contiene como sustratos de la reacción 10ml de PB 0,1M, 5mg de DAB (3,3'-Diaminobenzidina tetrahidroclorada; Sigma Aldrich, San Luis, Misuri, EE.UU.), 4mg de Citocromo C (Sigma Chemical, St. Louis, Missouri, EE.UU.) y 0,4g de sacarosa. A continuación, se coloca la placa en una estufa a 37°C en agitación, para favorecer la oxigenación del tejido para oxidar el DAB, y en oscuridad durante un tiempo mínimo de 3 horas. El tiempo de revelado puede variar en función del grado de fijación del tejido durante la perfusión. Tras esto se lavaron en PB 0,1M y se montaron como se ha descrito en el apartado anterior. Antes de cubrir los portaobjetos, se deshidrataron por inmersión durante 3 minutos en alcoholes de concentraciones crecientes (70°, 80°, 90° y 100°), y de igual forma se desengrasaron en xileno durante 60 minutos. Estos intervalos de tiempo seguidos durante deshidratación y desengrasado de las secciones fueron utilizados en todos los experimentos con procesamiento histoquímico. Por último, fueron cubiertas con un cubreobjetos utilizando como medio de montaje DePeX®.

5.2.2 Inmunofluorescencia de CTB libre

En los pocos casos en los que utilizamos como trazador retrógrado CTB libre, al no estar unida a una molécula fluorescente, tras el corte seriado del tejido, las secciones se recogieron en dos series y a la primera de ellas se le realizó una inmunofluorescencia frente al CTB para añadirle esta molécula fluorescente que permitiera su visualización. Con el fin de amplificar la señal de marcaje, las técnicas de inmunofluorescencia, al igual que las inmunohistoquímica, más empleadas son las indirectas. El fundamento de esta técnica consiste en la detección de la presencia de una determinada proteína, y no de su actividad. Para ello, se utilizan un anticuerpo primario (Ac 1) dirigido frente a una cadena de aminoácidos específica de la proteína que se quiere detectar y uno secundario (Ac 2) fluorescente que reconoce y une al primario por varios

epítomos de su fracción constante con lo que permite la amplificación de la reacción. En la segunda serie se hizo una reacción de CyO como hemos detallado en el apartado anterior.

Para llevar a cabo la inmunofluorescencia tomamos como modelo una versión modificada del protocolo de Heise y Mitrofanis (2004). En oscuridad, tras lavar el tejido en las placas multipocillo con PB 0,1M en agitación, se incubó con la solución de Ac 1 contra CTB en suero de conejo (List Biological Laboratories, Burlingame, California, EE.UU.) en proporción 1:500 disuelto en PB 0,1M, Tritón X-100 (TX-100) al 1% (Sigma Chemical, St. Louis, Missouri, EE.UU.) y suero normal de cabra (NGS) al 3% durante 48 horas a 4°C en agitación y oscuridad. Tras varios lavados de PB 0,1M en agitación, se incubó en la solución de Ac 2 obtenido en cabra contra la fracción constante de las inmunoglobulinas del conejo unido a Alexa Fluor® 546 a una concentración 1:200 (Life Technologies, Carlsbad, California, EE.UU.) disuelto en PB 0,1M, TX-100 al 1% y NGS al 3% durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación y oscuridad (Tabla 5). Al retirar el Ac 2, se lavaron múltiples veces en PB y se montaron las secciones sobre portaobjetos gelatinizados como se ha explicado anteriormente. Así como, en el caso de la deshidratación y desengrasado de las secciones que se realizó como para el resto de trazadores fluorescentes.

5.3 Experimentos de trazado anterógrado poblacional y célula única

5.3.1 Revelado de BDA

El revelado de este trazador se realizó tomando como referencia un protocolo modificado de Shu et al. (1988) basado en la intensificación mediante sulfato amónico de níquel y la reacción de la glucosa oxidasa con el DAB formando un precipitado negro visible bajo microscopía óptica. En estos experimentos de inyección micropoblacional de BDA, tras cortar los cerebros en micrótopo de congelación, como se ha descrito, se recogieron las secciones sagitales de 50µm en PB 0,1M y se dividieron en dos series. En la primera serie procedimos al revelado del marcado mediante histoquímica y en la segunda se reveló la actividad de CyO como se ha descrito en el apartado 5.2.1.

Iniciamos el revelado lavando las secciones en PB 0,1M para quitar los posibles restos de sacarosa de los cortes. El primer paso es inactivar la peroxidasa endógena lavando durante 20 minutos a temperatura ambiente con agua oxigenada al 0,66% en PB 0,1M. Todo el procesamiento se realizó en flotación con las secciones en las placas multipocillo y en agitación. Después de varios lavados de PB 0,1M, las secciones se incubaron durante 2 horas a temperatura

ambiente (o durante una noche a 4°C) con el complejo avidina-biotina (ABC Elite®; 1 gota de solución A y 1 gota de solución B por cada 5 ml; Vector Laboratories, California, EE.UU.) en PB 0,1M con 2% de TX-100, que amplificará la señal de la proteína diana a detectar. Tras la incubación en ABC se realizaron varios lavados en PB 0,1M seguidos de dos más en tampón acetato sódico (TAS) 0,1M. El revelado de la peroxidasa se realizó con una solución con DAB al 0,02% intensificando con sulfato amónico de níquel (1,2% níquel sulfato, 0,02% cloruro amónico) en TAS 0,1M. Como enzima catalizadora de la reacción utilizamos la glucosa oxidasa al 0,003% (Sigma Chemical, St. Louis, Missouri, EE.UU.) y su sustrato de reacción (0,2% D-glucosa). Este abordaje tiene la ventaja respecto al revelado con peróxido de hidrógeno de permitir un revelado muy controlado sin que se produzcan depósitos inespecíficos de DAB en el tejido. El proceso se realizó bajo agitación manual y en frío, para ralentizar la reacción, supervisándolo en todo momento bajo el microscopio óptico, ya que el tiempo de revelado puede ser entre 5 y 20 minutos. Después de varios lavados en TAS 0,1M y PB 0,1M para eliminar los restos de solución de revelado, y las secciones se montaron con PB 0,03M en portaobjetos y se dejaron secar toda la noche como hemos descrito anteriormente (apartado 5.2.1). Por último, previo a la deshidratación se los cortes se realizó una contratinción con tionina diluída (1:10; Panreac, Barcelona, España) que marca los somas neuronales, y de esta forma junto a la CyO nos permiten delimitar núcleos talámicos para situar la posición exacta del depósito, regiones subcorticales así como varias áreas y capas corticales que reciben terminales axónicos marcados de estas poblaciones neuronales para localizarlos en las reconstrucciones. Finalmente se procedió a deshidratar, desengrasar y cubrir los portaobjetos siguiendo los tiempos que se indicaron en el apartado 5.2. Este tipo de revelado lo realizamos también en los experimentos de viriones AAV y Sindbis, así como en los de electroporación de DNA y RNA.

5.3.2 *Inmunohistoquímica contra eGFP*

En los experimentos que acabo de mencionar, al final del apartado anterior, todos tienen en común que para ambos tipos de vectores virales tanto en los casos de inyección del virión completo o de únicamente su material genético sin la cápside, todos están diseñados para expresar GFP. Tras cortar los cerebros en secciones con un grosor de 50µm se observaron directamente con la ayuda de un microscopio óptico de epifluorescencia (filtro BV2A) para determinar si el experimento había sido exitoso. En los casos afirmativos, se observaba claramente el campo somatodendrítico pero la fluorescencia del axón era casi indistinguible. Es por ello, que para la visualización completa e intensificación del marcado axónico se realizó una inmunohistoquímica frente a la proteína GFP.

Las secciones en flotación en PB 0,1M se lavaron en placa multipocillo y en este caso no se realizaron series para otras tinciones histológicas, ya que queríamos tener todos los cortes para la posterior reconstrucción de las neuronas únicas o de las micropoblaciones. A excepción de los experimentos de inyección poblacional del vector AAV en el SC, donde se realizaron dos series y la primera se procesó como se detalla a continuación. En las secciones se inactivó la peroxidasa endógena del tejido durante 20 minutos a temperatura ambiente con agua oxigenada al 0,66% en PB 0,1M. Tras sucesivos lavados con TX-100 al 2% en PB 0,1M, seguidamente las secciones fueron incubadas durante una noche a temperatura ambiente con un Ac 1 policlonal anti-GFP en suero de conejo (1:500; EXBIO, Praga, República Checa), 2% TX-100, 3% de NGS, 1% de albúmina de suero bovino (BSA) y 0,1% de azida. Después de múltiples lavados en PB 0,1 M durante al menos 30 minutos, las secciones fueron incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente con un Ac 2 biotinilado obtenido en cabra contra la fracción constante de las inmunoglobulinas del conejo a concentración 1:100 (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EE.UU.), 2% TX-100, 3% NGS, 1% BSA y 0,1% de azida en PB 0,1M (Tabla 5). A continuación, para el proceso de revelado se siguió el mismo protocolo que el descrito en el revelado de BDA, incubando las secciones en ABC para la amplificación del marcado y usando el método glucosa oxidasa-DAB-níquel para su revelado obteniendo un precipitado negro. Los cortes fueron montados como se ha descrito previamente, y tras dejarlas secar al aire durante una noche, todas las secciones fueron contrateñidas levemente con tionina diluida para tener referencias arquitectónicas, antes de ser deshidratadas.

5.3.3 *Doble inmunomarcado de eGFP y el transportador vesicular de glutamato tipo 2 (VGluT2)*

En los casos referidos en el apartado anterior en que se realizaron inyecciones del vector viral AAV en el SC, en una segunda serie de secciones se realizó una doble inmunofluorescencia para detectar el GFP que expresa el vector viral y el transportador vesicular de glutamato tipo 2 con la finalidad de observar colocalización de las dos proteínas en sus terminales del complejo LP mediante microscopía confocal.

Para ello, las secciones pertenecientes a esta serie lavaron con TX-100 al 2% en PB 0,1M, y a continuación se incubaron en una mezcla del Ac 1 policlonal anti-eGFP en conejo (1:500) y Ac 1 policlonal contra VGluT2 obtenido en conejillo de indias (1:2000; Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) junto a 2% TX-100, 5% NGS y 1% BSA en PBS 0,1M durante una noche a 4°C en agitación. Después de múltiples lavados durante 30 minutos, las secciones fueron incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente con la mezcla de Ac 2 secundario IgG anti-conejo en

suero de cabra conjugado a Alexa Fluor® 546 (1:200; Life Technologies, Carlsbad, California, EE.UU.) y Ac 2 contra la fracción constante de las inmunoglobulinas del conejillo de indias en suero de cabra conjugado a Alexa Fluor® 488 (1:200; Invitrogen, Molecular Probes, Oregon, EE.UU.), 2% TX-100 y 2% NGS en PB 0,1M (Tabla 5). Después de varios lavados en PB 0,1M, las secciones fueron montadas, deshidratadas y cubiertas como se describe en el apartado 5.2 para trazadores fluorescentes.

5.4 Tinciones para la delimitación de núcleos talámicos y áreas corticales de interés

Las tinciones que se describen a continuación se han escogido específicamente para ayudar en la delimitación en el tálamo del núcleo dLGN y subdivisiones del complejo LP, así como para delimitar las áreas corticales visuales primaria (V1) y secundarias (LM, LI, P, AL, RL, A, AM, PM, MM y POR). Fueron especialmente valiosas todas estas tinciones para la realización del atlas estereotáxico de los niveles sagitales más laterales del encéfalo del ratón, así como para la generación de un mapa plano de la superficie de un hemisferio cortical.

5.4.1 Tinciones de Nissl y Gallyas

Para su realización se sacrificó a un animal, cuyo encéfalo se cortó de forma seriada y se dividió en dos series de secciones con un grosor de 50µm adyacentes. En la primera se efectuó una tinción de Nissl, ésta es considerada la tinción citoarquitectónica tradicional. Este método histológico básico tiñe los ácidos nucleicos de la cromatina en el interior del núcleo y los polirribosomas citoplasmáticos (gránulos de Nissl) debido a su afinidad por los colorantes catiónicos, en este caso, se utilizó el violeta de cresilo (Nissl 1913). Con ello, permite delimitar núcleos y capas corticales en función del tamaño global y disposición de las neuronas que las conforman. Esta tinción se inicia tras montar las secciones en portaobjetos y dejarlas secar una noche como ya se ha descrito. A continuación, introducimos los portaobjetos en etanol al 100% y cloroformo (1:1) durante 12 horas. Al día siguiente, se realizaron lavados rápidos en agua destilada y se sumergieron en cristalizadores con violeta de cresilo durante 5 minutos en un baño caliente para mantener la temperatura a 30°C. Tras teñirse, se elimina el exceso de colorante aclarándose rápidamente con agua destilada. Los cortes se deshidrataron por inmersión en alcoholes (70° y 95°), y seguidamente en cloroformo al 100% en agitación. Las secciones se diferenciaron con una solución de alcohol acético con etanol de 96° controlando la cantidad de diferenciación de forma visual, y después se realizaron varios lavados con alcohol al

100%. Por último, se procedió a desengrasar 60 minutos los cortes en xileno y se cubrieron con el medio de montaje DePeX®.

Para visualizar las fibras mielínicas se realizó una tinción de Gallyas a partir de una modificación del protocolo original (Gallyas 1979) llevada a cabo por Sánchez-Lozano y Cavada. Esta técnica está basada en la impregnación de las fibras mielínicas como producto de la precipitación de sales de nitrato de plata debida a la capacidad reductora de la mielina en el tejido. Todo el proceso se realizó en agitación y en campana sobre placas multipocillo excepto el primer paso que se realizó en vasitos de cristal debido a la alta corrosividad de la piridina. Se comenzó lavando los cortes en agua destilada para incubarlos en una solución de piridina y ácido acético glacial a una concentración de 2:1 durante 30 minutos. A continuación, se hicieron dos lavados rápidos y un lavado de 3 minutos en agua destilada y se incubaron en la solución de impregnación (disueltos orden en agua destilada nitrato amónico (al 0,1%) y nitrato de plata (al 0,1%), para evitar su precipitación, y se añadió hidróxido de sodio 1M, lentamente, hasta ajustar a un pH de 7,5) durante 45 minutos en oscuridad. Después, los cortes fueron sumergidos 3 veces durante 3 minutos en ácido acético al 0,5% para detener la reacción y eliminar el exceso de plata. Tras esto, se incubaron en la solución de desarrollo durante 1 hora y 40 minutos para estabilizar la reacción. Para esta solución se mezclaron lentamente y en orden tres soluciones: A (agua destilada y carbonato sódico al 5%), B (agua destilada, nitrato amónico al 0,2%, nitrato de plata al 0,2% y ácido silicotúngstico al 10%) y C (solución B una concentración del 0,75% de paraformaldehído al 35 %), en una proporción 2:1:1. Se sumergieron entonces en ácido acético al 1% durante 5 minutos y se lavaron rápidamente en agua destilada. Por último, se fijaron en una solución de tiosulfato al 5% sumergiendo los cortes 5 y 30 minutos cambiando la solución; en este paso se limpiaron los cortes de restos de plata que no se hubiesen fijado y se estabilizaron aquellos que sí. Por último, se hicieron dos lavados rápidos en agua destilada y se montaron las secciones utilizando una solución de montaje específica de pH bajo (solución de tampón acetato 0,2M a pH 3,33 formada por 100ml de una solución de acetato sódico al 13,68% en agua destilada, 95ml de otra solución de ácido clorhídrico al 3,65% en agua destilada y agua destilada, resultando en una). Finalmente, se cubrieron los cortes tal y como se ha explicado para la tinción de Nissl.

5.4.2 Inmunohistoquímica frente a calretinina (CR), calbindina (CB) y VGluT2

El resto de tinciones para la delimitación citoarquitectónica de núcleos talámicos y áreas corticales, se basaron en técnicas inmunohistoquímicas para la detección de las proteínas CR, CB y vGluT2. El protocolo utilizado en todos los casos es muy similar que el descrito en el

apartado 5.3.2 para la inmunohistoquímica frente a GFP variando los anticuerpos primario y secundario dirigidos a la proteína específica diana y los tiempos y condiciones de incubación (Tabla 5). Para su realización se tomaron las secciones con un grosor de 50µm divididas en dos series procedentes de un animal y una serie de otro animal, de forma que en todos los casos la distancia entre cortes de cada inmunohistoquímica es de 100µm, que será muy importante para la elaboración del atlas.

En la primera serie, los cortes en flotación en los que se había realizado el lavado con PB 0,1M, la inactivación de la peroxidasa endógena y los lavados con TX-100 al 2% en PB 0,1M, se incubaron con el Ac 1 frente a CR producido en conejo (1:5000; Swant, Marly, Suiza), 2% TX-100, 3% de NGS, 1% de BSA y 0,1% de azida durante una noche a temperatura ambiente. Tras lavar las secciones intensamente, se incubaron con la solución de Ac 2 biotinilado obtenido en cabra contra la fracción constante de las inmunoglobulinas del conejo (1:100; Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EE.UU.), 2% TX-100, 3% NGS, 1% BSA y 0,1% de azida en PB 0,1M durante 2 horas a temperatura ambiente. El protocolo para el revelado de los Ac 2 biotinilados fue el mismo que en el apartado del revelado de BDA (5.3.1), así como el montaje de los cortes revelados sobre portas, deshidratado, desengrasado y, finalmente, cubrirlos con medio de montaje.

En la segunda serie, el inmunomarcado iba dirigido frente a CB. Es por ello que las secciones se procesaron como en el caso de la CR pero incubándose con Ac 1 frente a CB en suero de ratón (1:2000; Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EE.UU.), 2% TX-100, 3% de NGS, 1% de BSA y 0,1% de azida durante dos noches a 4°C. Y, posteriormente, en un Ac 2 biotinilado frente a las IgG de ratón producido en suero de cabra (1:500; Vector Laboratories, California, EE.UU.) junto a 2% TX-100, 3% de NGS, 1% de BSA y 0,1% de azida durante dos horas a temperatura ambiente.

Para finalizar, la inmunohistoquímica frente a vGluT2 se describió en el apartado 5.3.3 cuando se detallaba el experimento de inmunofluorescencia doble. En este caso, la única variación en el protocolo que hemos realizado ha sido el uso de un Ac 2 biotinilado en lugar de fluorescente, así que el único paso en el que difiere es en la incubación con Ac 2 frente a la fracción constante de las inmunoglobulinas del conejillo de indias obtenido en cabra (1:200; Vector Laboratories, California, EE.UU.), 2% TX-100, 3% NGS, 1% BSA y 0,1% de azida en PB 0,1M durante 2 horas a temperatura ambiente. Por último, el revelado se realizó como el descrito en el apartado del BDA (5.3.1).

Tabla 5. Anticuerpos empleados en las técnicas inmunohistoquímicas y de inmunofluorescencia para la detección de las distintas proteínas y trazadores neuronales.

Ac 1				
Ac	Origen	Fuente	Dilución	Tiempo incubación/Tª
CTBlibre	Conejo	List Biological	1:500	2 noches/4°C
GFP	Conejo	EXBIO	1:500	1 noche/ Tamb
vGluT2	Conejillo indias	Merck Millipore	1:2000	1 noche/Tamb
CR	Conejo	Swant	1:5000	1 noche/Tamb
CB	Ratón	Sigma-Aldrich	1:2000	2 noches/4°C

Ac 2				
Ac	Origen	Fuente	Dilución	Tiempo incubación/Tª
Conejo-Alexa Fluor®546	Cabra	Life Technologies	1:200	2 horas/Tamb
Conejo-biotinilado	Cabra	Sigma-Aldrich	1:100	2 horas/Tamb
Conejo- Alexa Fluor® 546	Cabra	Life Technologies	1:200	2 horas/Tamb
Conejillo indias- Alexa Fluor® 488	Cabra	Molecular Probes	1:200	2 horas/Tamb
Ratón-biotinilado	Cabra	Vector Laboratories	1:500	2 horas/Tamb
Conejillo indias-biotinilado	Cabra	Vector Laboratories	1:200	2 horas/Tamb

6 MÉTODOS DE ANÁLISIS

6.1 Generación de un atlas de las secciones sagitales más laterales del encéfalo de ratón

Tras la aplicación de los trazadores neuronales y su procesamiento histológico para su visualización, el siguiente paso era el análisis detallado de estos experimentos. Comenzamos el análisis identificando la posición exacta de las inyecciones retrógradas corticales así como las inyecciones de trazador anterógrado en los núcleos talámicos diana. En ambos casos utilizamos inicialmente las figuras sagitales del atlas estereotáxico de ratón de Franklin y Paxinos (2008) por su gran precisión comparado con otros atlas de ratón disponibles como el Allen Mouse Brain Atlas (Feng et al. 2015; ©2014 Allen Institute for Brain Science, AMRA). Pero nos encontramos el mismo problema en los dos atlas, que las representaciones de secciones sagitales sólo llegaban hasta el nivel mediolateral (ML) 3,72 mm aunque nuestros cortes, en muchos casos con marcado axónico procedente de inyecciones de trazadores anterógrados, se extendían lateralmente hasta 1 mm más. Es por ello que tuvimos que realizar una batería de tinciones histoquímicas e inmunohistoquímicas para ser capaces de trazar los límites de las principales

áreas del polo temporal. Para ello, nos basamos en la tinción de Nissl, CyO, Gallyas e inmunomarcado de CB, CR y vGluT2 (Figura 62), cuidando de que durante el corte de los encéfalos implicados y su procesamiento no perdiéramos ningún corte. Una vez que conseguimos identificar las principales áreas corticales, teníamos que comprobar que los límites considerados se correspondían estrechamente con las delimitaciones en las secciones coronales.

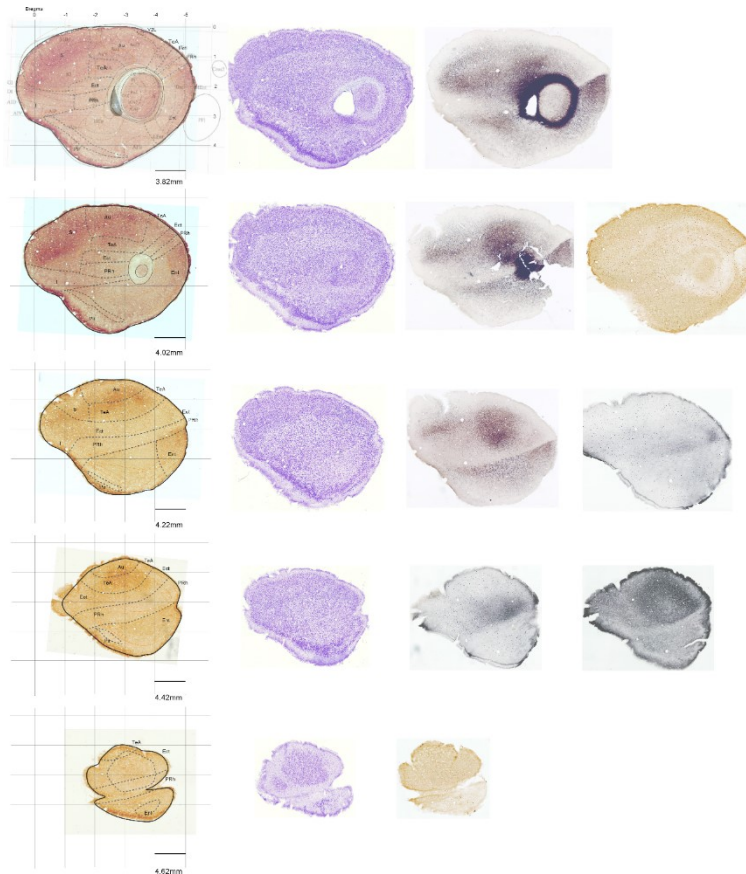


Figura 62. Generación de un atlas estereotáxico del polo temporal del encéfalo del ratón tomando basándonos inicialmente en varias tinciones histoquímicas e inmunohistoquímicas representadas en la figura como CyO, Nissl, Gallyas, CB, CR y vGluT2, cuya superposición permitió delimitar varias áreas parieto-temporales.

Para este fin, consideramos varias técnicas ampliamente utilizadas en la bibliografía consultada para explorar estructuralmente la conectividad en modelos de ratón. Los atlas más convencionales se basan en la interpretación histológica del material teñido para mostrar la cito, quimio o mieloarquitectura; obteniendo como resultado una serie de esquemas mostrando delimitaciones de núcleos y áreas corticales en los distintos planos de corte considerados e incluyéndolas en un espacio de referencia, lo que permite generar un sistema de coordenadas estereotáxicas estándar basadas en puntos de referencia en el cráneo para ayudar en las cirugías basadas en la estereotaxia (Papp et al. 2014). Pero para comprobar la precisión de estos atlas existen múltiples técnicas de imagen que permiten generar un atlas digital en 3 dimensiones en el que se incluyen los tres planos principales de segmentación (sagital, coronal y horizontal) permitiendo la visualización simultánea de un mismo punto en los tres planos, aunque en este

tipo de atlas la resolución no sea comparable a los anteriormente mencionados basados en microscopía. Usando técnicas de imagen se han realizado múltiples atlas en el ratón mediante tomografía computerizada, tomografía de emisión de positrones o resonancia magnética, aún así siguen apareciendo nuevos debido a dos factores que los diferencian de los atlas estereotáxicos en 2 dimensiones, y son la precisión y el detalle (revisado por Boline et al. 2008). Considerando todo esto, escogimos el atlas volumétrico de mayor resolución hasta ahora publicado, Waxholmm Space Atlas que une las técnicas de histología basada en resonancia magnética junto con imagen de tensor de difusión ajustada con secciones con tinción de Nissl (Johnson, Badea, et al. 2010; Jiang y Johnson 2011; Papp et al. 2014; Sergejeva et al. 2015), lo que aumenta al máximo la resolución espacial isotrópica (considerando cada cubo o vóxel de 43 μm de lado) con la mínima distorsión (Calabrese et al. 2015). La adquisición de las imágenes originales y el volumen de segmentación se llevó a cabo utilizando INFC Software Center (<http://software.incf.org/software>). Para su visualización y delimitación de las regiones anatómicas diana de nuestro estudio, usamos el programa ITK-SNAP v2.2.0 (Yushkevich et al. 2006; <http://www.itksnap.org>) superponiendo y anclando nuestras series de secciones con las distintas técnicas histológicas utilizadas. Mediante este programa comprobamos las equivalencias de los límites trazados en nuestras secciones en el plano sagital, en los otros dos planos de corte (Figura 63).

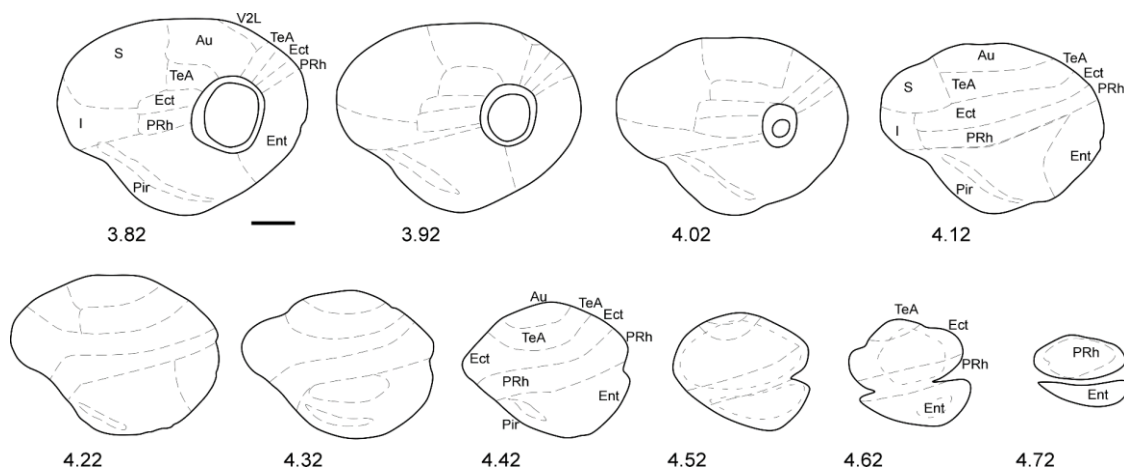


Figura 63. Esquemas obtenidos a partir de la delimitación de áreas mediante las distintas tinciones histoquímicas utilizadas junto a la corrección de estos límites realizada con la ayuda del atlas tridimensional (Calabrese et al. 2015). El número indicado en cada sección se corresponde con su coordenada ML (mm). Barra de calibración 1 mm.

6.2 Generación de un mapa plano de la superficie cortical

Una vez que conseguimos localizar bajo el microscopio con alta precisión la situación de las inyecciones retrógradas en la corteza así como las proyecciones corticales de las neuronas de dLGN y el complejo LP, y representarlas sobre los esquemas sagitales del atlas de Franklin y Paxinos (2007) y nuestro atlas lateral, nos encontramos otro inconveniente. Para mejorar la visualización, especialmente del marcaje cortical de las neuronas TC, y poder comparar los patrones de proyección dentro y entre los núcleos diana de este estudio, creamos un mapa bidimensional de la superficie cortical de un hemisferio del ratón tomando como referencia la delimitación anatómica y nomenclatura de las secciones sagitales del atlas de Franklin y Paxinos (2008) y de nuestro atlas inicialmente (Figura 64). Para la delimitación del borde medial del hemisferio también tomamos como referencia el mapa plano generado a partir de secciones coronales en nuestro laboratorio (Rubio-Garrido et al. 2009).

sobre líneas verticales separadas entre sí por la misma longitud que las secciones del atlas de Franklin y Paxinos (125 μ m), y nuestro atlas (100 μ m), alineadas tomando como referencia la extensión AP del cuerpo calloso y en el eje ML bregma. Posteriormente, se delimitaron de nuevo aumentando el detalle las principales áreas corticales diana de las neuronas TC de los núcleos estudiados, consultando los principales estudios anatómicos y fisiológicos que abarcan este aspecto (Figura 65). La nomenclatura utilizada para las áreas corticales así como el resto de estructuras encefálicas mencionada en este trabajo es la utilizada por Franklin y Paxinos (2007) a excepción de las áreas contenidas en la región cortical extraestriada que proviene de Wang y Burkhalter (2007), y la región de corteza extraestriada en la región sombreada que queda por debajo del polo occipital, a la que hemos denominado V2MMoc y V2Loc debido a que no existe consenso de qué tipo de áreas corticales se trata desde el punto de vista hodológico y funcional.

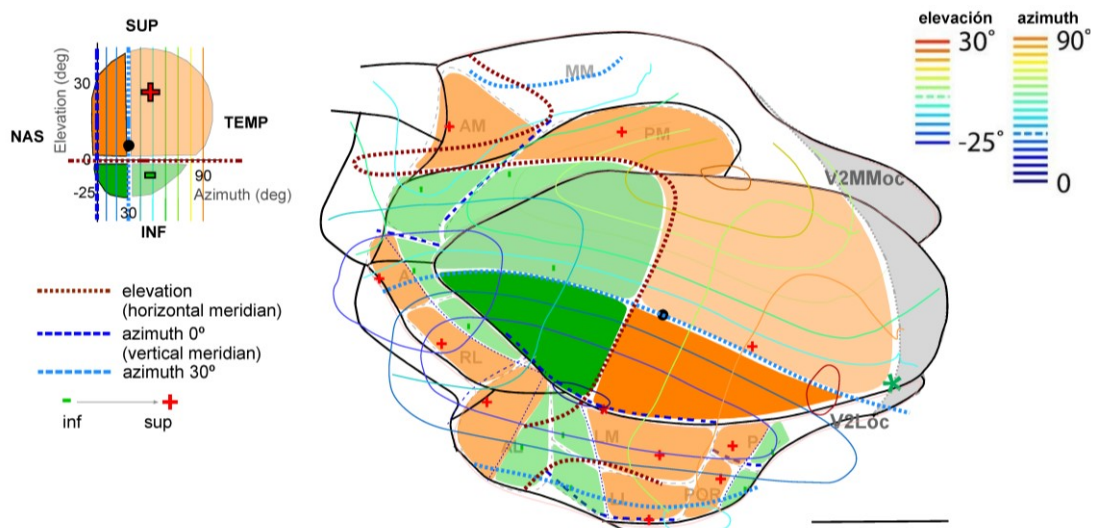


Figura 65. Mapa plano de la superficie cortical de las áreas visuales estriada y extraestriada donde se indica los cuadrantes superior (naranja) e inferior (verde) del campo visual, equivalentes en la representación del campo visual del ratón situado en la esquina superior izquierda de la figura. Así mismo, se indican los distintos grados de 10° de elevación y azimuth del campo visual en una progresión (leyenda situada en la esquina superior derecha), así como azimuth 0° y elevación 0° (leyenda en el extremo inferior izquierdo). Barra de calibración de 1mm.

La bibliografía consultada para la realización de este mapa fue, junto con la citada en la figura anterior, Wang et al. 2011; Marshel et al. 2012; Wilks et al. 2013; Tohmi et al. 2014; Ji et al. 2015; Hawrylycz et al. 2016; Sreenivasan et al. 2016; Zhuang et al. 2017.

6.3 Análisis de los experimentos de trazado retrógrado

6.3.1 Microscopía de epifluorescencia

Los experimentos con inyección de trazadores retrógrados directa o indirectamente fluorescentes, a pesar de la existencia de más de un depósito por animal se analizaron de forma

independiente. Se representaron las inyecciones corticales en el mapa plano que acabábamos de generar, examinando los cortes bajo el microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E600 con cámara digital (Nikon DMX1200; Nikon, Tokio, Japón) controlada por el software Nis-Elements® BR 3.2. En el caso de trazadores fluorescentes se utilizaron los objetivos, acoplados a este microscopio, Nikon plan flúor adecuados para cada trazador (UV2A, ex 330 – 380, para FB y FG; B2A, ex 450 – 490, para CTB-488 y G2A, ex 510 – 560 para CTB-594), estos objetivos se caracterizar por tener altas aperturas numéricas que mejoran mucho la detección de imágenes fluorescentes. Y tras observar que el transporte retrógrado había sido exitoso y había somas con un marcado óptimo en el tálamo, se tomaron las fotografías del depósito con el aumento 4x para delimitarlo con mayor precisión superponiendo las secciones del atlas de Franklin y Paxinos, para representarse finalmente en el mapa plano, el cual se redibujó utilizando el programa de imagen y diseño vectorial Canvas® (versión X; ACD Systems, Victoria, Canadá).

Una vez representados los depósitos, se tomaron microfotografías con el objetivo de 20x de los somas retrógradamente marcados en todas las secciones (separadas 100µm entre ellas). Usamos el mismo programa pero con un módulo capaz de hacer fotos en mosaico al estar conectado a una platina motorizada (ProScan, Prior, Cambridge, Inglaterra) acoplada al microscopio, con el fin de tener un amplio campo de visión y tener puntos de referencia para delimitar estructuras. De todos modos, para una precisa delimitación de los núcleos talámicos donde aparecían los somas, se realizaron fotografías a 4x de las mismas secciones utilizando el filtro B2A, así como de la sección adyacente revelada para CyO de forma que se obtenía una panorámica del corte completo a gran resolución. Para el análisis de los somas marcados, las imágenes en mosaico a 20x se abrieron con el programa Canvas® donde éstos se marcaron, modificando en algunos casos parámetros de brillo y contraste para asegurarnos que estaban realmente marcados y no era un artefacto debido a la autofluorescencia del tejido. Con la ayuda de las imágenes panorámicas del filtro B2A y adyacentes de CyO que superpusimos y alineamos sirviéndonos de los haces de fibras circundantes como referencia, delineamos los contornos de varios núcleos talámicos. También nos ayudó el atlas de Franklin y Paxinos, y los esquemas delimitando dLGN y LP que hemos realizado basándonos en múltiples tinciones histoquímicas e inmunohistoquímicas, como describimos en el apartado de resultados.

6.4 Análisis de los experimentos de trazado anterógrado

Tras el procesamiento histológico y revelado de los experimentos poblacionales tanto de BDA como de viriones de AAV, el primer paso fue localizar la posición exacta del centro de la inyección y su extensión en cada caso. Para ello, se fotografiaron en mosaico los depósitos

usando el objetivo de 10x con la cámara digital (DMX 1200F; Nikon, Tokio, Japón) y usando la herramienta de perímetro del programa NIS-Elements® se estimó el tamaño del depósito en los casos de BDA en toda su extensión o se contó el número de somas marcados en los experimentos de vectores AAV. Nos servimos de las referencias citoarquitectónicas que ofrece la contratinción de tiónina, y mieloarquitectónicas de la CyO del corte adyacente, superponiendo todas las imágenes usando el programa Canvas® y representando los depósitos de trazador en nuestros esquemas de dLGN y LP con ayuda del atlas de Franklin y Paxinos (2008). En los casos de depósitos en estos dos núcleos, se volvieron a dibujar los depósitos, tras anclar las secciones fotografiadas a las imágenes de nivel ML más próximo del atlas volumétrico que previamente habíamos utilizado (apartado 6.1) usando programa IKT-SNAP, que nos permitió obtener un volumen 3D en el que quedaban incluidos los depósitos y mejoraba su visualización. En el caso de las inyecciones con viriones AAV en el SC, se delimitó la extensión del depósito en términos de las capas que abarcaba para determinar si era válido cuando estaba restringido a las capas superficiales.

El siguiente paso era el análisis de los campos terminales en estructuras tanto corticales como subcorticales. Se llevó a cabo un exhaustivo examen bajo microscopía óptica de campo claro (en algunos casos de muy baja densidad de terminales se usó el campo oscuro) utilizando los aumentos de 20x y 40x, y dibujando bajo cámara clara los parches terminales en algunos casos o tomando fotos en mosaico a estos aumentos con la cámara digital Nikon DMX 1200F y reconstruyendo el marcado de los terminales con ayuda del programa Canvas® en casos de arborizaciones terminales menos profusas como en el estriado o en casos representativos del marcaje cortical para cada uno de los núcleos talámicos objeto de este estudio. Los dibujos de los terminales corticales bajo cámara clara se realizaron sobre secciones sagitales del atlas de Franklin y Paxinos, detallando la distribución areal y laminar de las proyecciones. A continuación, se representó el patrón de distribución tangencial de los axones para cada una de las capas corticales inervadas (en distinto color) a partir de las secciones sagitales en el mapa plano que habíamos generado. Por último, para facilitar el análisis de la localización de terminales marcados en estructuras corticales y subcorticales se generó una tabla que muestra la intensidad de marcado a nivel cualitativo observado en los campos terminales (ver en el apartado de resultados).

El último aspecto del análisis de los depósitos de trazador anterógrado por el que nos interesamos, fue el análisis comparativo del área de proyección máxima o transversal de las varicosidades axónicas entre las dos principales áreas corticales inervadas por los núcleos dLGN, como modelo de núcleo *driver*, y el núcleo LPMR, como modelo de núcleo *modulator*: V1 y

cortezas visuales asociativas. Escogimos las láminas de máxima densidad de innervación, siendo la capa 4 de V1 y capa 1 de áreas visuales extraestriadas para el dLGN, y capa 5 de V1 y capas 3b-4 de áreas extraestriadas en el caso de LPMR. Así utilizando la cámara digital Nikon DMX 1200F con un objetivo de 100x de inmersión y la herramienta de área del programa NIS-Elements®, delimitamos el contorno de un total de 300 varicosidades en cada capa y área en 3 animales distintos con depósitos de BDA, y tomando los campos de muestreo de forma aleatoria. El criterio que seguimos para clasificar un engrosamiento del axón como varicosidad, es que tuviera como mínimo el doble de grosor del axón contiguo. Con estos datos de área de proyección máxima en μm^2 , se compararon mediante análisis estadístico tras ser agrupados en intervalos discretos de $0,2\mu\text{m}^2$ y excluyendo los valores inferiores a $0,4\mu\text{m}^2$ por falta de resolución bajo microscopía óptica. Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el software SPSS (versión 24; IBM, Armonk, New York, EE.UU.). Para todos los test estadísticos realizados, el nivel de significación considerado es de $p < 0,05$, indicando en las figuras este nivel de significación como (*), $p < 0,01$ como (**) y $p < 0,001$ como (***). En primer lugar, realizamos la comprobación de la normalidad de las distribuciones mediante la prueba de Shapiro-Wilk. En todos los casos la prueba resultó significativa, lo que indica que las muestras no siguen una distribución normal y por tanto es necesario aplicar test no paramétricas. Con la finalidad de contrastar las distribuciones de frecuencias entre las áreas y láminas corticales muestreadas, analizamos la bondad de ajuste de las distribuciones aplicando el método no paramétrico de Kolmogorov-Smirnov (KS) para dos muestras independientes basado en la comparación entre las frecuencias acumuladas de dos distribuciones (revisado por Sheskin 2009). De igual forma para comparar las medianas de las poblaciones para las distintas capas y áreas por medio del test no paramétrico para muestras independientes de la U de Mann-Whitney.

6.4.1 Microscopía confocal

Algunos de los casos en los que se aplicaron mediante iontoforesis viriones de AAV en el SC para delimitar los núcleos del complejo LP receptores de sus proyecciones, se procesaron con técnicas de inmunofluorescencia doble para observar colocalización de estos terminales rellenos con eGFP y el transportador vesicular de glutamato 2. La visualización de estos experimentos se realizó mediante un microscopio Leica TCS SP5 (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Alemania) utilizando los objetivos de 20x y 63x; este último de inmersión en glicerol. Para este fin, utilizamos las líneas de láser argón 488nm y la línea de láser helio-neón (543nm), asegurando una completa separación de canales. Para su posterior análisis, se tomaron fotografías con el objetivo de 63x (más 3x de zoom digital) a distintos planos en el eje z separados por $0,5\mu\text{m}$, así obtuvimos por cada corte de $50\mu\text{m}$ de grosor se obtenían unas 28-40 imágenes de los distintos

planos en cada posición, debido a la compresión producida en el eje z durante el procesamiento. Al terminar la captura de las imágenes en los sucesivos planos de cada corte de interés y por separado en cada uno de los canales correspondientes a las dos longitudes de onda consideradas 488nm y 543nm, obteníamos automáticamente la proyección máxima de los planos por sección mezclando ambos canales. Sobre estas imágenes se observó la relación topográfica entre las dos proteínas consideradas (eGFP y vGluT2) en los terminales axónicos, gracias a la generación de la visión ortogonal de cada sección utilizando el programa Image-J (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, EE.UU.).

6.5 Análisis de los experimentos de trazado de neurona única

En los experimentos de inyección del virión Sindbis o de electroporación de su RNA o DNA del vector AAV, donde posteriormente se visualizaron tras su revelado entre 1 y 2 somas neuronales en un mismo núcleo talámico diana del estudio, se procedió a un análisis cualitativo y cuantitativo más extenso de sus proyecciones. Se comenzó con la representación sobre secciones sagitales de su marcado subcortical y cortical, y éste último se representó, tanto en términos de distribución tangencial como radial, sobre nuestro mapa plano. A continuación, fueron reconstruidas mediante la cámara clara utilizando los objetivos de 10x y 20x desde su dominio somatodendrítico hasta la totalidad de sus proyecciones subcorticales y corticales. Con el mapa plano de proyección cortical de la neurona como guía, se trazó utilizando el programa Neurolúcida (v17; standar package; mbf bioscience Europe, Deft, Holanda)

6.6 Estimaciones estereológicas

En dos casos muy concretos de nuestro estudio nos valimos de este método de cuantificación insesgada; para estimar el volumen nuclear y el número de células de los dos núcleos talámicos estudiados (dLGN y el complejo LP), y para el análisis cuantitativo del número de varicosidades y longitud de axón de cortical de las neuronas únicas marcadas. Este apartado del análisis se realizó mediante el programa de estereología newCAST (Visiopharm, Hørsholm, Dinamarca) utilizando un microscopio óptico Olympus BX61 (Olympus, Tokyo, Japón) equipado con un microcator Heidenhain MT 12 (0,5µm de resolución; Heidenhain, Traunreut, Alemania), una platina motorizada en los ejes X-Y-Z (ProScan II, Prior Scientific, Cambridge, Reino Unido), y una cámara digital Olympus DP-71 (Olympus, Tokyo, Japón).

6.6.1 Estimación del volumen nuclear (V_{nuc}) mediante el principio de Cavalieri

Tanto en este apartado como en el siguiente, las estimaciones se realizaron sobre los cortes coronales de 50 μ m teñidos con Nissl (por lo que se consideró corregir por encogimiento del tejido en el eje z los datos, esta corrección no afecta al volumen pero sí en la estimación del número de neuronas) de un total de 5 animales. La serie utilizada de Nissl era una de dos series de secciones totales con lo que la distancia entre secciones (T) era 100 μ m, y se muestrearon todas las secciones de esta serie que contuvieran alguno de estos dos núcleos talámicos. Para estimar el volumen de ambos núcleos se utilizó el principio de Cavalieri (Gundersen y Jensen 1987), de forma que tras delimitar precisamente los contornos de dLGN y LP con el objetivo de 4x (Figura 66), pasamos al objetivo 100x de inmersión y se superpuso una cuadrícula de puntos en forma de cruz con un área determinada de cada punto ($a(p)$ de 0,14mm²) para a continuación proceder a contar el número de puntos (P) que caían en estos núcleos. En las cruces que caían en el borde del área delimitada del núcleo seguimos el criterio de contar sólo aquellas cuyo ángulo superior derecho estaba en el interior del perímetro del corte. En todos los casos, las estimaciones estereológicas se presentan con su media, su desviación estándar (SD) y su desviación estándar de la media (SEM).

$$\widehat{V}_{nuc} = T \cdot a(p) \cdot \sum P$$

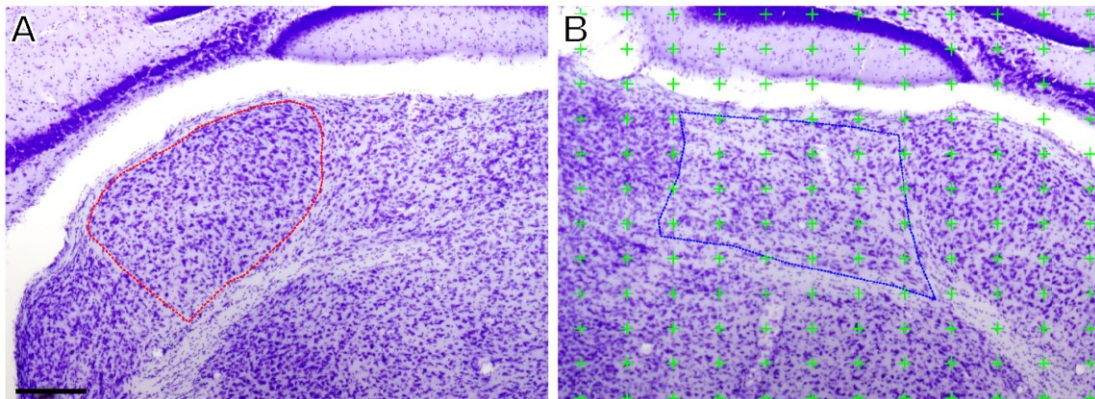


Figura 66. Microfotografías de dos secciones histológicas coronales del tálamo de ratón donde se representa el contorno del dLGN (rojo, A) y el LP (azul, B). En la fotografía de la izquierda (B) se observa la retícula de puntos (cruces verdes) usada para la estimación del volumen mediante el método de Cavalieri. Barra de calibración de 100 μ m.

6.6.2 Estimación del número de neuronas (N_{neu}) usando el fraccionador óptico

Para la estimación estereológica del número de neuronas del dLGN y el complejo LP utilizamos como herramienta el fraccionador óptico (West y Gundersen 1990). Esta técnica se basa en un muestreo sistemático, aleatorio y fraccionado, de una parte del tejido, usando disectores ópticos tridimensionales, donde no es necesario conocer el volumen de referencia. Como en el caso anterior, la serie utilizada de Nissl era la primera de dos totales con lo que la fracción de muestreo de secciones (ssf) era $\frac{1}{2}$ ya que fueron los mismos cortes analizados procedentes de los hemisferios derecho e izquierdo de 3 animales distintos. El muestreo en este caso se llevó a cabo bajo el objetivo de 100x de inmersión, y sobre la región delimitada por los contornos de los núcleos se realizó el muestreo sistemático, uniforme y aleatorio, que nos garantiza que todas las partes del núcleo tienen igual probabilidad de ser muestreadas (Figura 67). Inicialmente, realizamos un estudio piloto en un hemisferio de un animal para determinar los parámetros de la sonda de conteo en forma de meandro que permitieran una baja frecuencia de muestreo manteniendo el coeficiente de error por debajo de 0,1. Cuando determinamos estos parámetros del disector (Tabla 6), se colocaron con inicio al azar sobre nuestras regiones de interés en cada sección una retícula de disectores equidistantes con un área (a) y una distancia entre los mismos definida ($D_X \cdot D_Y$) previamente mediante el estudio piloto (este valor nos permite calcular la fracción de muestreo del área o asf) así como la altura del disector en el eje z (h) (este valor nos permite calcular la fracción de muestreo de la altura o hsf) con zonas de guarda por encima y por debajo del tejido definidas (para evitar el sesgo derivado de la pérdida de información por pérdida de partículas en el borde que se produce en las superficie superior e inferior de corte; (Andersen y Gundersen 1999; Baryshnikova et al. 2006). También medimos el grosor del corte (z) en cada sección con el microcator para calcular el grosor ponderado por número de células ($\bar{\epsilon}_Q$; Bermejo et al. 2003) y así mejorar la estimación en función de la disposición de las células debido al encogimiento irregular del tejido al haber sido cortado con el micrótopo de congelación y procesado para Nissl. Previo al conteo también tuvimos que establecer los criterios de inclusión de las unidades de conteo que, en este caso, fue morfológico ya que nos basamos en el mayor tamaño de las neuronas con respecto a las células de glía y su nucleolo claramente visible violeta, que marcamos cuando en su plano de foco permanecía dentro del disector sin tocar las caras superior e inferior en el eje z o los lados derecho y/o inferior del marco en el eje xy. Y procedimos a contar el número de nucléolos o partículas (Q). El muestreo fue realizado por dos observadores de forma independiente. Finalmente utilizamos la fórmula siguiente para calcular el número total de neuronas (N_N):

$$N_{neu} = \frac{1}{ssf} \cdot \frac{1}{asf} \cdot \frac{1}{hsf} \cdot \Sigma Q^{-}$$

ssf (fracción de muestreo de secciones), asf (fracción de muestreo de área; $\frac{a}{D_X \cdot D_Y}$), hsf (fracción de muestreo de altura; $\frac{h}{t_{Q^{-}}}$) y ΣQ^{-} el número de partículas o células contadas en cada región.

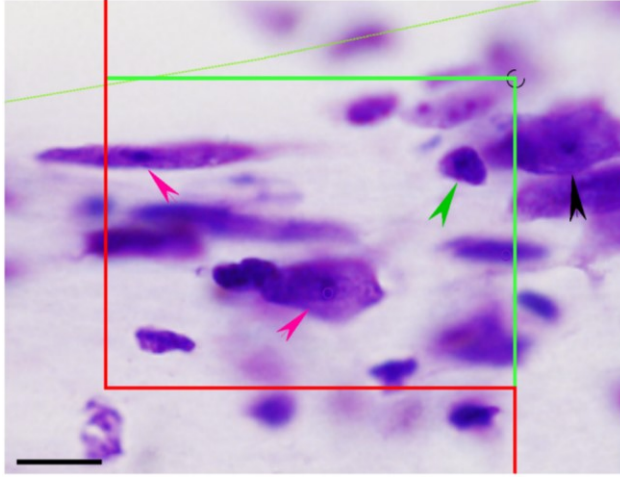


Figura 67. Microfotografía de una sección histológica coronal talámica donde aparece un ejemplo de somas de dLGN. Se muestra un marco de conteo inesgado con las dos líneas de exclusión (rojo) y las dos de inclusión (verde). Las puntas de flecha rosa indican los núcleos identificados que caen dentro del marco de conteo, mientras que en negro los núcleos localizados fuera de sus límites. Las puntas de flecha verde indican las células de glía observadas. Barra de calibración de 10μm.

6.6.3 Estimación del número de varicosidades (N_{var}) y longitud absoluta en las neuronas únicas (L_{ax})

Para hallar el número de varicosidades (N_{var}) utilizamos el mismo método inesgado que en el apartado anterior: el fraccionador óptico. Por lo que el desarrollo del método de conteo y cálculo del número de varicosidades se llevó a cabo del mismo modo usando el objetivo de 100x de inmersión, con algunas variaciones en los parámetros estereológicos aplicados a la sonda de muestreo que introducimos gracias a nuestro estudio piloto previo. Así, en cuanto a los componentes de la fracción total, ssf en este caso al cortar el encéfalo no se realizaron series de secciones ya que se trata de neuronas únicas donde son necesarios todos los cortes histológicos para su reconstrucción completa, por lo que sería 1 en teoría, aunque en realidad para el muestreo sólo se tomó una sección de cada dos, lo que tendría el valor de $\frac{1}{2}$. El resto de parámetros modificados se encuentran en la Tabla 6. Las regiones de interés, en este caso, se extendían a las principales áreas corticales diana de las neuronas TC marcadas con vectores virales que delimitamos previamente con el objetivo de 10x. También modificamos el criterio de inclusión al tratarse de una unidad de conteo distinta, y por ello consideramos como varicosidad todo engrosamiento que dobla la anchura de los segmentos de axón que la atraviesa, excluyendo los recodos de los axones y engrosamientos en puntos de ramificación. En los casos de ser una varicosidad terminal, comprobamos que realmente doblaba el grosor del axón

inmediato ya que puede existir controversia en estos casos. Finalmente contamos el número de varicosidades que aparecían dentro del marco del disector o bien que tocando sus márgenes izquierdo o superior (Figura 68).

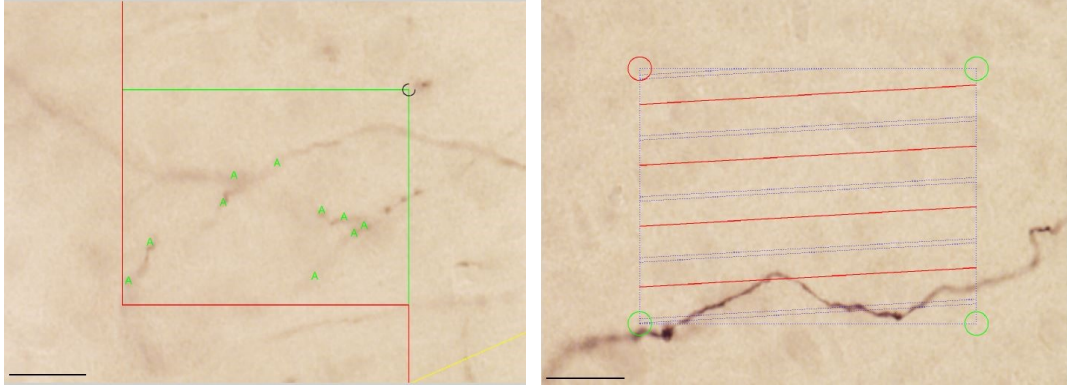


Figura 68. Microfotografías de dos secciones histológicas coronales donde aparece un ejemplo de axones y varicosidades axónicas en LM procedentes de una neurona aislada situada en LPL. (A) Se muestra un marco de conteo insesgado con las dos líneas de exclusión (rojo) y las dos de inclusión (verde), las letras A están situadas sobre algunas de las varicosidades identificadas en ese disector (B) Aparecen los planos virtuales paralelos situados aleatoriamente en todas las direcciones del espacio utilizados para estimar la longitud de axón en corteza. Barras de calibración de 10µm.

Para la estimación de la longitud absoluta de terminales axónicos corticales (L_{ax}) utilizamos el método de muestreo de los planos virtuales isotrópicos (Larsen et al. 1998). Escogimos este método ya que las secciones no se habían realizado con una orientación aleatoria en el espacio y además nuestros axones no estaban orientados isotrópicamente, por lo que utilizamos este tipo de sonda de muestreo que va a ser rotada para orientarse aleatoriamente en todas las direcciones atravesando nuestra sección. Es por todo ello que en este caso la unidad de medida serán los impactos o intersecciones (Q) de estos planos con los segmentos de axón marcado en los cortes. Considerando siempre la distancia de separación de estos planos virtuales (d) que en nuestro caso fijamos en 0.02mm. Como este método está basado en el diseño del fraccionador óptico la fracción total está formada por las mismas fracciones que se han descrito en el apartado anterior.

$$L_{ax} = \frac{1}{ssf} \cdot \frac{1}{asf} \cdot \frac{1}{hsf} \cdot d \cdot 2 \cdot \Sigma Q^-$$

Tabla 6. Parámetros estereológicos empleados en las estimaciones de número de neuronas y número de varicosidades.

Parámetro estereológico	N_{neu}	N_{var}
Área disector (a)	1750 μm^2	1160 μm^2
Distancia entre cortes ($D_X \cdot D_Y$)	40000 μm^2	10000 μm^2
Altura disector (h)	8 μm	10 μm
Zona de guarda superior	3 μm	3 μm
Grosor ponderado (\bar{t}_{Q-})	15 μm	17 μm

Finalmente, para medir la precisión de las estimaciones estereológicas realizadas se calculó el coeficiente de error (CE) debido al método de muestreo descrito por Gundersen et al. 1999. Comprobando en todo momento que el CE no superara 0,1.

Tabla 7. Resumen del total de casos inyectados con trazadores retrógrados en distintas áreas corticales indicando los parámetros utilizados para la realización del depósito mediante presión, la localización del mismo y las incidencias. Ver lista de abreviaturas.

Casos	Trazador	Método Inyecc.	D. pipeta (µm)	Volume Inyecc. (nl)	Localización	Éxito/Comentarios
R173HD	FB 0,1%	Picospritzer	12	~ 30-35	V1	Demasiado extenso,contamin AM, PM
R222HI	FB 0,1%	Picospritzer	12	~ 30-35	V1	Demasiado extenso,contamin AM, PM
R216HD	FB 0,1%	Picospritzer	15	~ 30-35	V1	Demasiado extenso,contamin AM, A
R216HI	FB 0,1%	Picospritzer	15	~ 30-35	V1	No transporte
R223HD	FB 0,1%	Picospritzer	12	~ 30-35	V1	Si
R224HD	FB 0,1%	Picospritzer	10	~ 30-35	V1med	Si
R224HI	FB 0,1%	Picospritzer	10	~ 30-35	V1lat	No transporte
R225HD	FB 0,1%	Picospritzer	12	~ 30-35	V1med	Inyecc muy pequeña, escaso transporte
R225HI	FB 0,1%	Picospritzer	12	~ 30-35	V1lat	Inyecc muy pequeña, escaso transporte
R249HD	FB 1%	Picospritzer	13	~ 30-35	V1	Si
R249HI	FB 1%	Picospritzer	13	~ 30-35	V1	Si
R253HD	CTB green	Nanoyector	15	4,6x6	A	No transporte
R254HI1	CTB red	Picospritzer	15	~ 30-35	LM	No transporte
R254HI2	FB 0,1%	Picospritzer	15	~ 30-35	PM	Si, inyecc pequeña
R255HI1	CTB red	Nanoyector	10	4x13	LM	No transporte
R255HI2	FB 0,1%	Picospritzer	10	~ 30-35	V1	Demasiado extenso,contamin varias áreas
R257HI1	CTB green	Nanoyector	12	9,2x3	V1	Si, contamin LM
R257HI2	CTB red	Nanoyector	12	9,2x3	PM	No transporte
R258HI1	CTB red	Nanoyector	12	9,2x2	LM	Si
R258HI2	CTB green	Nanoyector	12	9,2x2	V1	Si, contamin PM
R259HI1	CTB green	Nanoyector	10	4,6x4	V1	Si, contamin LM
R259HI2	CTB red	Nanoyector	10	4,6x4	P	Si, contamin TeA y Ect
R260HI1	CTB red	Nanoyector	10	4,6x3	LM	No transporte
R260HI2	CTB green	Nanoyector	10	4,6x4	PM	No transporte
R261HI1	CTB red	Nanoyector	12	4,6x3	LM	No transporte
R261HI2	CTB green	Nanoyector	10	4,6x3	A	No transporte
R262HI1	CTB green	Nanoyector	12	4,6x3	V1	Inyecc muy pequeña, escaso transporte
R262HI2	CTB red	Nanoyector	8	4,6x4	AL	Inyecc muy pequeña, escaso transporte
R263HI1	CTB green	Nanoyector	8	4,6x3	AL-LM	Si, contamin V1
R263HI2	CTB red	Nanoyector	8	4,6x2	AL	Si, contamin LM, LI

MATERIALES Y MÉTODOS

R265HI1	CTB green	Nanoyector	10	4,6x3	V1	Si, contamin LM
R265HI2	CTB red	Nanoyector	8	4,6x3	LM	Inyecc muy pequeña, escaso transporte
R270HI1	CTB green	Nanoyector	9	4,6x4	V1	Si, contamin sustancia blanca
R270HI2	CTB red	Nanoyector	10	4,6x4	PM	Si, contamin V1
R277HI1	FB 0,75%	Nanoyector	13	4,6x4	V1	Muere
R277HI2	CTB red	Nanoyector	16	4,6x4	PM	Muere
R280HI	CTB red	Nanoyector	19	5x4	PM	No transporte
R285HI1	FB 0,75%	Nanoyector	21	2,1x5	MM	Si, contamin RSD
R285HI2	CTB green	Nanoyector	12	2,1x5	AL	Si, contamin AuD
R286HI	CTB green	Nanoyector	7	4,6x3	MM	No transporte
R299HI1	FB 1%	Nanoyector	7	4,6x3	PM	Si, contamin MM, RSD, RSG
R299HI2	FG	Nanoyector	7	4,6x3	LM	Si, contamin P, POR
R300HI1	FB 1%	Nanoyector	7	4,6x3	AL	Si
R300HI2	FG	Nanoyector	7	4,6x3	AM	Si, contamin MM, RSD
R337HI1	FB 1%	Nanoyector	10	9,2x2	AM	No transporte
R337HI2	CTB green	Nanoyector	10	9,2x2	AL	No transporte
R303HI1	FB 0,1%	Nanoyector	>8	9,2x2	MM	Si, contamin RSD, RSG
R303HI2	CTB green	Nanoyector	>4	9,2x2	AL	Si, contamin LM, LI
R304HI1	FB 0,1%	Nanoyector	>8	9,2x2	PM	Si
R304HI2	CTB green	Nanoyector	>8	9,2x2	LM	Inyecc muy pequeña, escaso transporte
R305HI1	FB 0,1%	Nanoyector	>4	2,3x3	PrL	Inyecc muy pequeña, escaso transporte
R305HI2	CTB green	Nanoyector	13	2,3x3	M1	Inyecc muy pequeña, escaso transporte
R306HI1	FB 0,1%	Nanoyector	13	2,3x3	FrA	Inyecc muy pequeña, escaso transporte
R306HI2	CTB green	Nanoyector	12	2,3x3	M2	Inyecc muy pequeña, escaso transporte
R307HI1	FB 0,1%	Nanoyector	13	2,3x4	FrA	Si
R307HI2	CTB green	Nanoyector	12	2,3x3	Cg1	Inyecc muy pequeña, escaso transporte
R308HI1	FB 0,1%	Nanoyector	13	2,3x2	LM	Si, contamin AL, LI, PtPR, S2
R308HI2	CTB green	Nanoyector	11	2,3x2	P	Inyecc muy pequeña, escaso transporte
R310HI1	FB 0,1%	Nanoyector	8	2,3x4	S2	Si
R310HI2	CTB green	Nanoyector	11	2,3x3	PrL	Si
R311HI1	FB 0,1%	Nanoyector	8	2,3x3	M1	Inyecc muy pequeña, escaso transporte
R311HI2	CTB green	Nanoyector	11	2,3x4	M2	Inyecc muy pequeña, escaso transporte
R312HI1	FB 0,1%	Nanoyector	11	2,3x3	P	No transporte

MATERIALES Y MÉTODOS

R312HI2	CTB green	Nanoyector	13	2,3x4	A	Demasiado extenso,contamin varias áreas
R313HI1	FB 0,1%	Nanoyector	>13	2,3x4	RL	No transporte
R313HI2	CTB green	Nanoyector	13	2,3x4	P	Si, contamin Tea, Ect
R314HI1	CTB red	Nanoyector	15	4,6x4	TeA	No transporte
R314HI2	FB 0,1%	Nanoyector	9	4,6x4	PPm	No transporte
R314HI3	CTB green	Nanoyector	20	4,6x4	LI	Si, contamin LM, POR
R315HI1	CTB red	Nanoyector	15	4,6x5	AuD	Muere
R315HI2	FB 0,1%	Nanoyector	9	4,6x5	PrL	Muere
R315HI3	CTB green	Nanoyector	20	4,6x4	PPI	Muere
R316HI2	FB 0,1%	Nanoyector	9	4,6x3	Ect	Muere
R331HI1	CTB green	Nanoyector	15	4,6x5	V1	No transporte
R331HI2	CTB free 0,1%	Nanoyector	11	4,6x4	POR	No transporte
R332HI1	CTB green	Nanoyector	15	4,6x4	V1	Si, contamin LM, POR
R332HI2	FB 0,1%	Nanoyector	11	4,6x3	LM	No transporte
R332HI3	CTB free 0,1%	Nanoyector	20	4,6x4	P	No transporte
R333HI1	CTB green	Nanoyector	15	4,6x4	V1	Si
R333HI2	FB 0,1%	Nanoyector	11	4,6x3	AL	Si, contamin S2, PtPR
R333HI3	CTB free 0,1%	Nanoyector	20	4,6x4	LM	Si, contamin P, V1
R334HI1	CTB green	Nanoyector	15	4,6x4	V1	Si, contamin V1, P
R334HI2	FB 0,1%	Nanoyector	15	4,6x3	LI	No transporte
R334HI3	CTB free 0,1%	Nanoyector	10	4,6x4	AL	Si, muy extensa, contamin AuD, S2, TeA, Ect
R335HI1	FB 0,1%	Nanoyector	15	4,6x3	RL	No transporte
R335HI3	CTB free 0,1%	Nanoyector	10	4,6x4	AM	No transporte
R336HI2	FB 0,1%	Nanoyector	10	4,6x3	MM	No transporte
R336HI3	CTB free 0,1%	Nanoyector	8	4,6x4	POR	No transporte
R340HI1	CTB green	Nanoyector	15	4,6x4	TeA	Si, contamin Ect, AuD
R340HI2	FB 0,1%	Nanoyector	10	4,6x3	POR	No transporte
R341HI1	CTB green	Nanoyector	15	4,6x4	A	Demasiado extenso,contamin varias áreas
R341HI2	FB 0,1%	Nanoyector	10	4,6x3	RSD	Demasiado extenso,contamin varias áreas
R342HI1	CTB green	Nanoyector	15	4,6x4	AL	Si, contamin AuD, S2
R342HI2	FB 0,1%	Nanoyector	10	4,6x3	MM	Si, contamin RSD
R343HI1	CTB green	Nanoyector	15	4,6x4	AM	Si, contamin LPtA
R343HI2	FB 0,1%	Nanoyector	10	4,6x3	AM	No transporte

MATERIALES Y MÉTODOS

R344HI1	CTB green	Nanoyector	15	4,6x4	V1caudal	Si
R344HI2	FB 0,1%	Nanoyector	10	4,6x3	PrL	No transporte, muy pequeña
R345HI1	CTB green	Nanoyector	15	4,6x5	V1caudal	Si
R345HI2	FB 0,1%	Nanoyector	10	4,6x3	MM	Si, contamin RSD
R346HI1	CTB green	Nanoyector	15	4,6x4	V1caudal	Si
R346HI2	FB 0,1%	Nanoyector	10	4,6x1	Cg2	No transporte
R347HI1	CTB green	Nanoyector	15	4,6x4	V1	Muere
R347HI2	FB 0,1%	Nanoyector	10	4,6x3	RSD	Muere

Tabla 8. Resumen del total de casos inyectados con trazadores anterógrados (BDA y vector AAV-GFP) en los distintos núcleos del tálamo visual de roedores y SC, indicando los parámetros utilizados para la realización del depósito mediante iontoforesis, la localización del mismo y las incidencias. Ver lista de abreviaturas.

Casos	Trazador	Método de inyección	Intensidad (nA)	t inyección (min)	D. pipeta (μm)	Localización	Éxito / Comentarios
R211HD	BDA	Iontoforesis	380	30	5	dLGN	No
R211HI	BDA	Iontoforesis	380	30	5	dLGN	No
R212HD	BDA	Iontoforesis	380	25	6	dLGN	No
R212HI	BDA	Iontoforesis	380	25	6	dLGN	No
R218HD	BDA	Iontoforesis	400	25	4	dLGN	Si
R218HI	BDA	Iontoforesis	400	25	4	dLGN	No, contamin VP
R219HD	BDA	Iontoforesis	400	25	4	LP	Si
R219HI	BDA	Iontoforesis	400	20	5	LP	No, contamin Po
R220HD	BDA	Iontoforesis	400	25	8	dLGN	Si
R220HI	BDA	Iontoforesis	400	20	8	dLGN	No, contamin VP
R221HD	BDA	Iontoforesis	400	25	5	dLGN	Si
R221HI	BDA	Iontoforesis	400	30	4	LP	No, contamin Po
R226HD	BDA	Iontoforesis	380	25	4	LPMC	Si
R226HI	BDA	Iontoforesis	380	20	4	dLGN	No, contamin IGL, MGN
R232HD	BDA	Iontoforesis	370	25	6	dLGN	No
R232HI	BDA	Iontoforesis	370	25	7	dLGN	No
R233HD	BDA	Iontoforesis	390	35	4	dLGN	Inyecc muy pequeña, escaso transporte
R233HI	BDA	Iontoforesis	400	35	4	dLGN	Inyecc muy pequeña, escaso transporte
R234HD	BDA	Iontoforesis	380	35	5	dLGN	Inyecc muy pequeña, escaso transporte
R234HI	BDA	Iontoforesis	390	35	4	dLGN	No
R235HD	BDA	Iontoforesis	390	35	4	dLGN	Inyecc muy pequeña, escaso transporte
R235HI	BDA	Iontoforesis	390	35	4	dLGN	No transporte
R236HD	BDA+FG	Iontoforesis	5000	10	15	LPL	Si, contamin LGN
R237HD	BDA+FG	Iontoforesis	3000	10	17		No, inyecc en HC
R239HD	BDA	Iontoforesis	380	30	5	LP	No
R239HI	BDA	Iontoforesis	380	30	6	LP	Si, contamin LD
R242HD	BDA	Iontoforesis	400	30	6	LP	No
R242HI	BDA	Iontoforesis	400	30	7	LP	No
R244HD	BDA	Iontoforesis	500	30	6	dLGN	Inyecc muy pequeña, escaso transporte
R244HI	BDA	Iontoforesis	450	30	6	dLGN	Si
R245HD	BDA	Iontoforesis	500	30	5	dLGN	Si, contamin VP
R245HI	BDA	Iontoforesis	450	30	5	dLGN	Si, contamin tracto opt
R246HD	BDA	Iontoforesis	750	30	4	dLGN	Si
R246HI	BDA	Iontoforesis	800	30	4	dLGN	Si, contamin MGN
R247HD	BDA	Iontoforesis	800	30	4	LPL	Si
R247HI	BDA	Iontoforesis	1000	20	4	dLGN	Si
R248HD	BDA	Iontoforesis	800	25	8	LPL	Si

MATERIALES Y MÉTODOS

R248HI	BDA	lontoforesis	1000	20	8	dLGN	Si
R250HD	BDA	lontoforesis	550	30	4	dLGN	Si
R250HI	BDA	lontoforesis	600	25	4	dLGN	Si
R251HD	BDA	lontoforesis	500	30	4	LPL	Inyecc muy pequeña, escaso transporte
R251HI	BDA	lontoforesis	400	30	5	LPL	No, contamin Po
R252HD	BDA	lontoforesis	400	30	2	dLGN	Si, muy extensa
R256HD	BDA	lontoforesis	550	25	6	LP	Si
R256HI	BDA	lontoforesis	500	25	6		No, inyecc en IGL
R258HD	BDA	lontoforesis	570	35	4	LPL-LPMR	Si, muy extensa
R263HD	BDA	lontoforesis	600	25	4	LPMR	Si, contamin Po
R265HD	BDA	lontoforesis	600	25	4		No, inyecc en HC
R270HD	BDA	lontoforesis	600	25	5		No, inyecc en Po
R273HD	BDA	lontoforesis	500	25	>3	LPL	Si
R273HI	BDA	lontoforesis	400	30	3	dLGN	Si
R275HD	BDA	lontoforesis	100	30	7	dLGN	Se atasca pipeta
R275HD	BDA	lontoforesis	400	35	6	LPL	Si, contamin dLGN
R277HD	BDA	lontoforesis	400	35	3	dLGN	Muere
R280HD	BDA	lontoforesis	350	40	3	dLGN	Si
R285HD	BDA	lontoforesis	230	45	3	LPL	Inyecc muy pequeña, escaso transporte
R286HD	BDA	lontoforesis	350	35	4	LPL	Si, contamin LPMR
R288HD	BDA	lontoforesis	350	45	4	LPMR	Si, contamin CL
R288HI	BDA	lontoforesis	350	40	4	LPMR	Si
R291HD	BDA	lontoforesis	100	45	4	LPL	Inyecc muy pequeña, escaso transporte
R291HI	BDA	lontoforesis	100	5	4	LP	No
R292HD	BDA	lontoforesis	180	45	7	LPMR	No, contamin APT
R292HI	BDA	lontoforesis	180	45	4	LPMR	No, contamin APT
R293HD	BDA	lontoforesis	150	50	2	LP	Si
R293HI	BDA	lontoforesis	150	50	3	LP	No, contamin LD
R294HD	BDA	lontoforesis	100	40	3	LPL	No, problema revelado
R294HI	BDA	lontoforesis	100	50	3	LPL	No, problema revelado
R295HD	BDA	lontoforesis	100	50	3	LPL	No, problema revelado
R295HI	BDA	lontoforesis	100	45	3	LPL	No, problema revelado
R296HD	BDA	lontoforesis	100	50	3	LPL	No, problema revelado
R296HI	BDA	lontoforesis	100	50	3	LPL	No, problema revelado
R297HD	BDA	lontoforesis	200	40	3		No, inyecc en HC
R297HI	BDA	lontoforesis	250	40	4	dLGN	Si
R298HD	BDA	lontoforesis	250	50	2	LPMR	Si, contamin APT, Pf
R298HI	BDA	lontoforesis	300	45	2	LP	No
R299HD	BDA	lontoforesis	250	50	4	LPMR	Si, contamin CL
R300HD	BDA	lontoforesis	250	45	4	LPMR	Si, contamin CL

R301HD	BDA	lontoforesis	300	40	6	LPMR	Si, contamin LD
R301HI	BDA	lontoforesis	300	40	5	LPMR	Si
AAV1HD	AAV virion 10 ¹⁰	lontoforesis	1000	1	5	dLGN	Si, muy extensa
AAV1HD	AAV virion 10 ¹⁰	lontoforesis	200	1	7	Po	Si, muy extensa
AAV1HI	AAV virion 10 ¹⁰	lontoforesis	200	5	7	dLGN	No
AAV1HI	AAV virion 10 ¹⁰	lontoforesis	1000	5	8	Po	Si, muy extensa
AAV2HD	AAV virion 10 ¹⁰	lontoforesis	500	5	10	dLGN	Si, muy extensa
AAV2HD	AAV virion 10 ¹⁰	lontoforesis	500	1	10	LP	Si, muy extensa
AAV2HI	AAV virion 10 ¹⁰	lontoforesis	400	5	15	dLGN	Si, muy extensa
AAV2HI	AAV virion 10 ¹⁰	lontoforesis	500	1	20	LP	Si, muy extensa
AAV3HD	AAV virion 10 ⁵	lontoforesis	200	4	16	dLGN	No
AAV3HD	AAV virion 10 ⁵	lontoforesis	200	1	18	LP	No
AAV3HI	AAV virion 10 ⁵	lontoforesis	200	4	20	dLGN	No
AAV3HI	AAV virion 10 ⁵	lontoforesis	200	1	20	LP	No
AAV4HD	AAV virion 10 ⁵	lontoforesis	100	2	8	LPL	No
AAV4HI	AAV virion 10 ⁵	lontoforesis	100	1	6	LPL	No
AAV5HD	AAV virion 10 ⁴	lontoforesis	100	1	11	LPL	No
AAV5HI	AAV virion 10 ⁴	lontoforesis	80	1	6	LPL	No
AAV6HD	AAV virion 10 ³	lontoforesis	80	7	5	LPL	No
AAV6HI	AAV virion 10 ³	lontoforesis	80	1	5	LPL	No
AAV7HD	AAV virion 10 ⁵	lontoforesis	700	5	>10	dLGN	No
AAV7HI	AAV virion 10 ⁵	lontoforesis	700	5	10	dLGN	No
AAV8HD	AAV virion 10 ⁵	lontoforesis	500	5	11	dLGN	No
AAV8HI	AAV virion 10 ⁵	lontoforesis	500	5	10	dLGN	No
AAV9HD	AAV virion 10 ⁴	lontoforesis	500	5	8	LP	No
AAV9HI	AAV virion 10 ⁴	lontoforesis	500	5	8	LP	No
AAV10HD	AAV virion 10 ³	lontoforesis	500	5	7	LP	No
AAV10HI	AAV virion 10 ³	lontoforesis	500	5	8	LP	No
AAV11HD	AAV virion 10 ³	lontoforesis	500	10	20	dLGN	No
AAV11HI	AAV virion 10 ³	lontoforesis	700	5	20	dLGN	No
AAV12HD	AAV virion 10 ⁹	lontoforesis	700	5	7	dLGN	Si, muy extensa
AAV12HD	AAV virion 10 ⁷	lontoforesis	500	5	8	LP	No
AAV12HI	AAV virion 10 ⁷	lontoforesis	500	5	8	dLGN	No
AAV12HI	AAV virion 10 ⁹	lontoforesis	700	5	7	LP	Si, muy extensa

MATERIALES Y MÉTODOS

AAV13HD	AAV virion 10 ³	lontoforesis	500	8	11	dLGN	No
AAV13HD	AAV virion 10 ⁵	lontoforesis	500	8	11	LP	No
AAV13HI	AAV virion 10 ³	lontoforesis	500	5	11	dLGN	No
AAV13HI	AAV virion 10 ⁵	lontoforesis	500	5	11	LP	No
AAV14HD	AAV virion 10 ³	lontoforesis	500	7	10	dLGN	No
AAV14HI	AAV virion 10 ³	lontoforesis	600	7	10	dLGN	No
AAV15HD	AAV virion 10 ⁹	lontoforesis	500	6	10	LPL	Si, muy extensa
AAV15HI	AAV virion 10 ⁷	lontoforesis	600	6	10	LP	No
AAV16HD	AAV virion 10 ⁵	lontoforesis	300	6	10	dLGN	No
AAV16HI	AAV virion 10 ⁵	lontoforesis	200	6	10	LP	No
AAV17HD	AAV virion 10 ³	lontoforesis	400	10	10	dLGN	No
AAV17HI	AAV virion 10 ³	lontoforesis	700	6	10	LP	No
AAV18HD	AAV virion 10 ⁷	lontoforesis	400	10	10	dLGN	No
AAV18HI	AAV virion 10 ⁷	lontoforesis	700	6	10	dLGN	No
AAV22HD	AAV virion 10 ⁹	lontoforesis	200	30	20	dLGN	Si, contamin LPL
AAV22HI	AAV virion 10 ⁹	lontoforesis	300	30	20		No, inyecc HC
AAV23HD	AAV virion 10 ⁹	lontoforesis	400	15	20	LP	Si, 5 neu APT
AAV23HI	AAV virion 10 ⁹	lontoforesis	600	15	20	LP	No
AAV25HD	AAV virion 10 ⁸	lontoforesis	700	15	20	LPL	Si, contamin dLGN, LPMC
AAV25HI	AAV virion 10 ⁸	lontoforesis	500	20	20	dLGN	No
AAV26HD	AAV virion 10 ⁸	lontoforesis	800	7	20	LPL	Si
AAV26HI	AAV virion 10 ⁸	lontoforesis	600	7	20	LPL	Si, 1 neu
R324HD	AAV virion 10 ⁹	lontoforesis	400	30	21	dLGN	Si
R324HI	AAV virion 10 ⁹	lontoforesis	600	15	20	LPL	Si, contamin LPL
R322HD	AAV virion 10 ⁹	lontoforesis	400	30	22	LPMC	Si (45 neu)
R322HI	AAV virion 10 ⁹	lontoforesis	600	20	10	LPMC	Si (18 neu)
R327HD	AAV virion 10 ⁸	lontoforesis	400	30	22	LPMR	No, mal revelado
R327HI	AAV virion 10 ⁸	lontoforesis	600	20	10	LPMR	Si
AAV30HD	AAV virion 10 ⁸	lontoforesis	400	30	20	dLGN	Si, 2 neu
AAV30HI	AAV virion 10 ⁸	lontoforesis	400	30	20	LPMR	No, somas retrógrados
AAV31HD	AAV virion 10 ⁸	lontoforesis	400	30	20	LPMR	No
AAV31HI	AAV virion 10 ⁸	lontoforesis	400	30	20	LPMR	Si, contamin LD
AAV32HD	AAV virion 10 ⁸	lontoforesis	400	30	20	APT	No
AAV32HI	AAV virion 10 ⁸	lontoforesis	400	30	20	LPMR	Si, contamin LPMC

AAV33HD	AAV virion 10 ⁸	lontoforesis	400	30	20	LPMR	No, contamin APT, CL
AAV33HI	AAV virion 10 ⁸	lontoforesis	400	30	20	LPMR	Si, contamin LPL
AAV34HD	AAV virion 10 ⁸	lontoforesis	350	30	25	LPL	No, contamin dLGN
AAV34HI	AAV virion 10 ⁸	lontoforesis	400	30	27	SC	Si
AAV35HD	AAV virion 10 ⁸	lontoforesis	400	30	27	SC	No, muy pequeña
AAV35HI	AAV virion 10 ⁸	lontoforesis	400	30	27	LPL	Si
AAV36HD	AAV virion 10 ⁸	lontoforesis	400	30	12	LPMR	Si
AAV36HI	AAV virion 10 ⁸	lontoforesis	400	30	12	SC	Si
AAV37HD	AAV virion 10 ⁸	lontoforesis	450	35	8	LPMR	Si
AAV37HI	AAV virion 10 ⁸	lontoforesis	350	40	8	SC	Si, 1 neu
AAV38HD	AAV virion 10 ⁸	lontoforesis	450	30	12	SC	Si
AAV38HI	AAV virion 10 ⁸	lontoforesis	300	35	7	LPMR	Si, contamin APT
AAV39HD	AAV virion 10 ⁸	lontoforesis	400	30	12	LPMR	No, contamin APT, CL
AAV39HI	AAV virion 10 ⁸	lontoforesis	400	30	12	LPMC	Si, contamin dLGN
R337HD	AAV virion 10 ⁸	lontoforesis	400	30	10	LPL	Si, 3 neu
R702HI	AAV virion 10 ⁹	lontoforesis	400	30	10	LPMR	Si, 4 neu LPMR y 1 neu Po

Tabla 9. Resumen del total de casos de neurona aislada inyectados con trazadores anterógrados (BDA y vector AAV-GFP) en los núcleos dLGN, LPL, LPMC y LPMR de roedores indicando los parámetros utilizados para la realización del depósito, dilución del vector viral AAV, el método de inyección (presión o electroporación), la localización del mismo y las incidencias. Ver lista de abreviaturas.

Caso	Trazador	Método de inyección	D. punta (μm)	Pulsos presión	Voltaje (V)	t espera (min)	Localización	Éxito / Comentarios
R290HD	SindBis virion 1/2 10 ⁷	Presión	14	3		10	LGN	No
R290HI	SindBis virion 1/2 10 ⁷	Presión	14	3		10	LGN	No
R290HI	SindBis virion 10 ⁶	Presión	14	3		10	LGN	No
R328HI	SindBis virion 10 ⁶	Presión	33	3		10	LPMR	No
R328HD	SindBis virion 1/2 10 ⁶	Presión	33	3		10	LPMR	No
R329HI	SindBis virion 1/2 10 ⁶	Presión	21	3		10	LPMR	No
R329HD	SindBis virion 10 ⁶	Presión	21	3		10	LPMR	No
R337HI	SindBis virion 10 ⁶	Presión	25	2		10	LPMR	Si, 2 neu
R338HI	SindBis virion 10 ⁶	Presión	27	2		10	LPL	Si, 3 neu mezcladas
R338HD	SindBis virion 1/2 10 ⁷	Presión	27	2		10	LPMC	Si, muchos somas
R348HI	SindBis virion 1/2 10 ⁷	Presión	20	2		10	LGN	No
R348HD	SindBis virion 1/2 10 ⁷	Presión	20	2		10	LGN	No
R349HI	SindBis virion 1/2 10 ⁷	Presión	30	2		10	LGN	No
R349HD	SindBis virion 1/2 10 ⁷	Presión	30	2		10	LGN	No
R350HI	SindBis virion 1/2 10 ⁷	Presión	30	2		10	LPL	No
R350HD	SindBis virion 1/2 10 ⁷	Presión	30	2		10	LPL	No
R351HI	SindBis virion 1/2 10 ⁷	Presión	30	2		10	LPL	No
R351HD	SindBis virion 1/2 10 ⁷	Presión	30	2		10	LPL	No
R238HD	SindBis RNA	Electropo	15	3	50 (x4)	5	LGN	No
R240HD	SindBis RNA	Electropo	15	3	50 (x4)	5	LGN	No
R240HI	SindBis RNA	Electropo	15	2	50 (x4)	5	LGN	No, 1 neu HC
R241HD	SindBis RNA	Electropo	15	3	50 (x4)	5	LGN	No, 1 astrocito
R241HI	SindBis RNA	Electropo	15	3	50 (x4)	5	LGN	No
R243HD	SindBis RNA	Electropo	20	3	50 (x4)	10	LGN	No
R243HI	SindBis RNA	Electropo	20	3	50 (x4)	10	LGN	No
R264HD	SindBis RNA	Electropo	16	3	50 (x5)	10	LGN	No, somas mal estado
R264HI	SindBis RNA	Electropo	16	3	50 (x5)	10	LGN	Si, 2 neu
R266HD	SindBis RNA	Electropo	30	5	50 (x5)	10	LGN	No, glia
R266HI	SindBis RNA	Electropo	30	4	50 (x4)	10	LGN	No
R267HD	SindBis RNA	Electropo	30	2	50 (x4)	10	LGN	No, 2 somas mal revelado
R267HI	SindBis RNA	Electropo	30	2	50 (x4)	10	LGN	No, 5 neu MGN, VPM, ZI
R268HD	SindBis RNA	Electropo	30	2	50 (x4)	10	LGN	Si, 1 neu LGN caudal

R268HI	SindBis RNA	Electropo	32	4	50 (x4)	10	LGN	Si, 1 neu LGN rostral
R269HD	SindBis RNA	Electropo	30	8	50 (x5)	10	LGN	No
R269HI	SindBis RNA	Electropo	25	3	50 (x5)	10	LGN	No
R271HD	SindBis RNA	Electropo	32	5	50 (x5)	10	LGN	No
R271HI	SindBis RNA	Electropo	35	7	50 (x5)	10	LGN	No, 1 neu HC
R272HD	SindBis RNA	Electropo	35	5	50 (x5)	10	LGN	No
R272HI	SindBis RNA	Electropo	36	2	50 (x5)	10	LGN	No
R274HD	SindBis RNA	Electropo	25	5	50 (x4)	15	LGN	No
R274HI	SindBis RNA	Electropo	25	4	50 (x4)	15	LGN	No, 1 glia
R276HD	SindBis RNA	Electropo	30	4	50 (x4)	5	LGN	No
R276HI	SindBis RNA	Electropo	30	4	50 (x4)	5	LGN	No
R278HD	SindBis RNA	Electropo	32	2	50 (x4)	10	LGN	No
R278HI	SindBis RNA	Electropo	34	3	50 (x4)	5	LGN	No, fibras no soma
R279HD	SindBis RNA	Electropo	30	3	50 (x4)	5	LGN	No
R279HI	SindBis RNA	Electropo	30	3	50 (x4)	5	LGN	No, 1 neu HC y glia
R281HD	SindBis RNA	Electropo	32	3	50 (x4)	8	LGN	No
R281HI	SindBis RNA	Electropo	37	3	50 (x4)	10	LGN	Si, 3 neu mezcladas
R282HD	SindBis RNA	Electropo	32	4	50 (x4)	10	LGN	No, 1 astrocito
R282HI	SindBis RNA	Electropo	28	2	50 (x4)	10	LGN	No
R283HD	SindBis RNA	Electropo	15	4	50 (x3)	10	LGN	No
R283HI	SindBis RNA	Electropo	13	4	50 (x3)	10	LGN	No
R284HD	SindBis RNA	Electropo	18	4	50 (x4)	10	LGN	No
R284HI	SindBis RNA	Electropo	29	3	50 (x4)	10	LGN	No, 1 astrocito
R287HD	SindBis RNA	Electropo	37	3	50 (x4)	5	LGN	No
R287HI	SindBis RNA	Electropo	27	3	50 (x4)	5	LGN	No, 1 astrocito
R289HD	SindBis RNA	Electropo	20	3	50 (x3)	8	LGN	No
R289HI	SindBis RNA	Electropo	10	3	50 (x3)	8	LGN	No
EP25HD	SindBis RNA	Electropo	40	3	50 (x3)	10	LPL	No
EP25HI	SindBis RNA	Electropo	40	3	50 (x3)	10	LPL	No, 1 glia
EP26HD	SindBis RNA	Electropo	30	3	50 (x3)	10	LPL	No
EP26HI	SindBis RNA	Electropo	30	3	50 (x3)	10	LPL	No
EP27HD	SindBis RNA	Electropo	30	3	50 (x3)	10	LPMC	No
EP27HI	SindBis RNA	Electropo	25	3	50 (x3)	10	LPMC	No
EP28HD	SindBis RNA	Electropo	20	3	50 (x3)	10	LPMR	No, 1 glia
EP28HI	SindBis RNA	Electropo	20	3	50 (x3)	10	LPMR	No, 1 glia
EP29HD	SindBis RNA	Electropo	25	3	50 (x3)	10	LPMR	No
EP29HI	SindBis RNA	Electropo	25	3	50 (x3)	10	LPMR	No
EP30HD	SindBis RNA	Electropo	30	3	50 (x2)	10	LPMR	No
EP30HI	SindBis RNA	Electropo	30	3	50 (x2)	10	LPMR	No
EP31HD	SindBis RNA	Electropo	25	3	50 (x2)	10	LPMR	No

EP31HI	SindBis RNA	Electropo	25	3	50 (x2)	10	LPMR	No
EPD1	SindBis RNA	Electropo	20	3	50 (x3)	10	LPL	No
EPD2	SindBis RNA	Electropo	20	3	50 (x3)	10	LPL	No, 1 neu HC
EPD3	SindBis RNA	Electropo	20	3	50 (x3)	10	LPL	No
EPD4	SindBis RNA	Electropo	20	3	50 (x3)	10	LPL	No, 1 neu Po
EPD5	AAV DNaplasmid	Electropo	20	5	50 (x3)	10	LPL rostral	Si, 1 neu
EPD6	SindBis RNA	Electropo	20	5	50 (x3)	10	LPMC	No, 1 glía
EPD7	SindBis RNA	Electropo	20	5	50 (x3)	10	LPMC	No
EPD8	AAV DNaplasmid	Electropo	20	5	50 (x3)	10	LPMC	No
EPD9HD	AAV DNaplasmid	Electropo	18	5	50 (x3)	10	LPMC	No
EPD9HI	AAV DNaplasmid	Electropo	15	5	50 (x4)	10	LPMC	No, 2 neu HC
EPD10HD	AAV DNaplasmid	Electropo	15	7	50 (x4)	10	LPMC	No
EPD10HI	AAV DNaplasmid	Electropo	18	7	50 (x4)	10	LPL	No, 1 neu LPL sin axón
EPD11HD	AAV DNaplasmid	Electropo	11	7	50 (x4)	10	LPL	No
EPD11HI	AAV DNaplasmid	Electropo	11	7	50 (x4)	10	LPL	No
EPD11HDbis	AAV DNaplasmid	Electropo	36	9	50 (x4)	10	LPL	No
EPD11HIbis	AAV DNaplasmid	Electropo	20	9	50 (x4)	10	LPL	No
EPD12HD	AAV DNaplasmid	Electropo	14	9	50 (x3)	10	LPL	No
EPD12HI	AAV DNaplasmid	Electropo	14	9	50 (x3)	10	LPL	No
EPD13HD	AAV DNaplasmid	Electropo	14	9	50 (x3)	10	LPMR	No
EPD13HI	AAV DNaplasmid	Electropo	14	9	50 (x3)	10	LPMR	No
EPD14HD	AAV DNaplasmid	Electropo	13	9	50 (x3)	10	LPMR	No
EPD14HI	AAV DNaplasmid	Electropo	13	5	50 (x3)	10	LPMR	No
EPD15HD	AAV DNaplasmid	Electropo	11	5	50 (x3)	10	LPMR	No
EPD15HI	AAV DNaplasmid	Electropo	11	5	50 (x3)	10	LPMR	No
EPD16HD	AAV DNaplasmid	Electropo	21	5	50 (x3)	10	LPMR	No
EPD16HI	AAV DNaplasmid	Electropo	21	5	50 (x3)	10	LPMR	No, 1 neu en subículo
EPD17HD	AAV DNaplasmid	Electropo	20	5	50 (x3)	10	LPMR	No
EPD17HI	AAV DNaplasmid	Electropo	20	5	50 (x3)	10	LPMR	No, 1 neu MGN
EPD18HD	AAV DNaplasmid	Electropo	10	5	50 (x3)	10	LPMR	No
EPD18HI	AAV DNaplasmid	Electropo	10	5	50 (x3)	10	LPMR	No

IV RESULTADOS

Los resultados presentados a continuación describen la conectividad TC entre los principales núcleos que componen el tálamo visual en roedores (dLGN y el complejo LP). Debido a la gran controversia que ha existido durante años a la hora de establecer los límites entre estas estructuras del tálamo dorsal de roedores nocturnos, así como para subdividir el complejo LP formado por núcleos homológica y funcionalmente muy distintos, consideramos necesario caracterizar anatómicamente estos núcleos y establecer unos límites congruentes entre los mismos, como un paso previo al estudio de su conectividad eferente.

Una vez delimitados con precisión, estudiamos la posibilidad de encontrar una organización topográfica específica de las conexiones que establecen cada uno de estos núcleos del tálamo visual. Para ello, realizamos una gran variedad de experimentos de trazado axónico retrógrado desde múltiples regiones de la representación del campo visual localizadas en la corteza estriada V1, así como en distintas localizaciones del conjunto de áreas visuales extraestriadas que rodean V1.

Tras comprobar la correcta delimitación y topografía de los cuatro núcleos talámicos analizados en este trabajo (dLGN, LPL, LPMC, LPMR) con el trazado retrógrado, examinamos la distribución cortical y subcortical de los terminales axónicos procedentes de las neuronas de proyección talámica de cada uno de estos núcleos del tálamo visual del ratón de forma cualitativa y cuantitativa mediante trazado anterógrado poblacional, junto a experimentos de marcado de neuronas aisladas en estos núcleos. La distribución cortical, tanto areal como laminar, de los terminales axónicos de las neuronas contenidas en nuestros núcleos de estudio se representa en mapas aplanados bidimensionales de la superficie cortical. Tras analizar por separado los casos de trazado axónico anterógrado, tanto poblacional como de neurona aislada, éstos fueron agrupados en función del núcleo del tálamo visual al que estaba restringida la inyección de trazador para describir su patrón de distribución areal global. Finalmente, en el caso de las neuronas aisladas, realizamos un análisis cuantitativo de sus proyecciones corticales principales mediante la medición del área de proyección máxima de las varicosidades axónicas y la estimación estereológica del número de las mismas y longitud de axón total.

1 CARACTERIZACIÓN ANATÓMICA DE LOS NÚCLEOS dLGN Y EL COMPLEJO LP

1.1 Descripción anatómica y análisis cuantitativo del dLGN y LP

El primer paso en un estudio sistemático de los dos grandes núcleos que componen el tálamo visual del ratón es la caracterización citoarquitectónica y la delimitación de los núcleos objeto del estudio. Dado que se han descrito ampliamente a nivel cualitativo los límites de ambos núcleos en roedores en base a la cito- y mieloarquitectura mediante las tinciones de Nissl, CyO y AChE (Jones 2007, Franklin y Paxinos 2007), nos permitió llevar a cabo un estudio cuantitativo del volumen y número de neuronas en el núcleo dLGN y el complejo LP (Figura 69). Hasta el momento apenas existen estudios de este tipo realizados en núcleos talámicos visuales en ratones adultos, a excepción de algunos realizados a distintas edades postnatales (Dursun et al. 2013). Por otro lado, existen también estudios similares en ratas (Sugita et al. 1983), primates (Blasco et al. 1999; Ahmad y Spear 1993; Berman et al. 1998) y humanos (Byne et al. 2002; Selemon y Begovic 2007; Dorph-Petersen et al. 2009), los cuales en muchos casos utilizan como herramienta de conteo la estereología.

La importancia de estos estudios en ratón es muy alta si consideramos la explosión de modelos transgénicos y knockout que se han ido desarrollando en las últimas décadas, en los que el aumento o disminución en la expresión de un determinado gen puede implicar grandes cambios a nivel cuantitativo en una o múltiples estructuras encefálicas. Además múltiples estudios de lesión de una estructura encefálica, axotomías, que se han usado comúnmente a lo largo de los años como un método de trazado axonal (Montero y Guillery 1968b; Agarwala y Kalil 1998), o modelos animales de patologías visuales o motoras que en muchas ocasiones inducen la muerte neuronal en núcleos talámicos ofrecen resultados a nivel cualitativo en muchos casos. Sin embargo, es interesante que estos trabajos se comparen con el estudio cuantitativo del estado del LGN y complejo LP en condiciones normales para detectar estos cambios en su morfología. Aquí es donde reside la relevancia de conocer en detalle mediante técnicas estereológicas el volumen, número de neuronas y densidad neuronal en la cepa más utilizada de ratón C57BL.

Para este estudio se examinó el tálamo de forma bilateral de 5 animales machos adultos de la misma edad y sin tratamiento de ningún tipo (número hemisferios 10). La delimitación de ambos núcleos fue realizada por dos investigadores distintos mediante una tinción de Nissl que permite además reconocer eficazmente el núcleo celular para el conteo de los somas neuronales presentes en la muestra. Las estimaciones del volumen y número de neuronas obtenidas

mediante los métodos estereológicos no sesgados de Cavalieri y fraccionador óptico se corresponden con la media de los dos observadores que realizaron el conteo, y aparecen reflejadas en las Tablas 10 y 11, para el núcleo dLGN y para el complejo LP respectivamente.

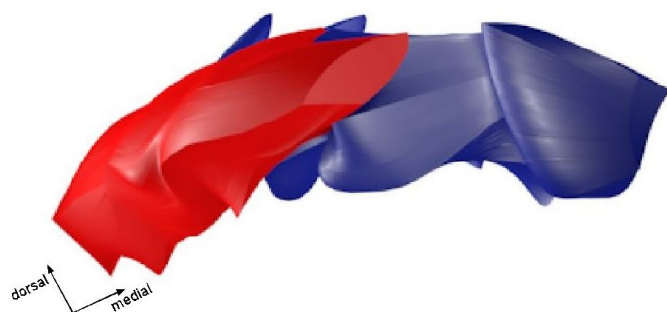


Figura 69. Representación en 3D del núcleo dLGN (rojo) y el complejo LP (azul) realizada con el programa IKT-SNAP a partir de un atlas de resonancia magnética del ratón.

Tabla 10. Estimación del número de neuronas (N) y del volumen nuclear (V) de dLGN en cada uno de los 10 hemisferios analizados junto a su coeficiente de error (CE), y en la última fila de la media de todos los casos junto a su desviación estándar (SD).

Caso	N (neuronas)	CE(N)	V (mm ³)	CE(V)
N150HD	18678	0,071	0,231	0,095
N150HI	19912	0,070	0,242	0,093
N172HD	18630	0,050	0,248	0,075
N172HI	18954	0,053	0,279	0,071
N229HD	23980	0,051	0,270	0,072
N229HI	23462	0,051	0,288	0,070
N1HD	20920	0,058	0,225	0,079
N1HI	20049	0,057	0,246	0,075
N2HD	23571	0,058	0,232	0,078
N2HI	23771	0,056	0,245	0,076
Mean ± SD	21193 ± 2264		0,250 ± 0,021	

Tabla 11. Estimación del número de N y del V del complejo LP en cada uno de los 5 animales analizados junto a su CE, y en la última fila de la media de todos los casos junto a su SD.

Caso	N (neuronas)	CE(N)	V (mm ³)	CE(V)
N150HD	30536	0,054	0,414	0,058
N150HI	30536	0,054	0,388	0,060
N172HD	35107	0,049	0,389	0,060
N172HI	31630	0,051	0,399	0,059
N229HD	34942	0,050	0,343	0,064
N229HI	37757	0,049	0,361	0,062
N1HD	41623	0,051	0,308	0,067
N1HI	43543	0,049	0,315	0,067
N2HD	33460	0,055	0,312	0,067
N2HI	39153	0,051	0,321	0,066
Mean ± SD	35829 ± 2960		0,355 ± 0,040	

1.2 Delimitación de las subdivisiones del LP

El complejo LP se sitúa en una posición dorsal y medial al dLGN, pero extendiéndose en niveles más caudales que el dLGN, se encuentra también limitando rostralmente con el núcleo talámico lateral dorsal (LD), caudalmente con el área pretectal (APT), ventralmente con el núcleo posterior del tálamo (Po) y medialmente con los núcleos dorsomedial (MD) y central-lateral (CL). Dentro de este complejo nuclear podemos distinguir hasta cuatro subdivisiones (LPLR, LPLC, LPMC, LPMR) en base a la cito- y mieloarquitectura complementada con técnicas de inmunodetección de determinadas proteínas que presentan una distribución particular dentro del complejo LP y por ello ayudan a trazar sus límites. A nivel hodológico y funcional, como observaremos más adelante, se distinguen únicamente tres núcleos: LPL, LPMC, LPMR. Como se observa a lo largo de este trabajo, se han realizado secciones sagitales de todos los encéfalos utilizados debido a que tal y como se describe en la literatura, y ha quedado planteado en nuestra hipótesis inicial, la proyección principal de estos núcleos del tálamo visual es a cortezas occipitales y por esto es necesario utilizar este tipo de secciones. Además de por el elevado riesgo que implica cortar los encéfalos en secciones coronales y perder información en cuanto a las proyecciones hacia el lóbulo occipital. Por ello, resolvimos desarrollar todo nuestro estudio sobre cortes sagitales del ratón, lo que dificulta en mayor medida la delimitación de las subdivisiones del complejo LP.

La delimitación de sus territorios se llevó a cabo, inicialmente, en base a su cito- y mieloarquitectura mediante una tinción de Nissl, un Gallyas y una tinción histoquímica para la enzima CyO. Pero posteriormente, estudiando su quimioarquitectura, realizamos varias tinciones inmunohistoquímicas frente a las principales proteínas que mostraban un marcado diferencial en el complejo LP (CR, CB, vGluT2) con la finalidad de esclarecer los criterios de delimitación de estos núcleos (Figura 70). Finalmente, se realizaron depósitos del vector viral AAV-GFP en las capas superficiales del SC para delimitar la región caudal del complejo LP en base a sus aferencias, las neuronas infectadas se revelaron en fluorescencia junto a una tinción inmunofluorescente frente a CR para distinguir el núcleo LPMC donde aparecía doble marcado (Figura 71).

La inmunotinción frente a CR y vGluT2 observamos que arrojaba gran claridad para el trazado del límite entre LPLC y LPMC en las secciones más laterales del complejo LP, ya que la porción posterior de este complejo va a presentar alta inmunoreactividad ante vGluT2, aunque aparece un marcado más oscuro en LPMC y más débil en LPLC. Además su porción medial muestra inmunoreactividad frente a CR permitiendo trazar los bordes del LPMC y del LPMR en

niveles laterales (Figura 70, secciones A-E y A'-E'). Por otro lado, la tinción histoquímica de CyO va a marcar, en niveles mediales del complejo LP, las dos estructuras diencefálicas que lo limitan rostral- y caudalmente, LD y APT (Figura 70, secciones F'-H'). Mientras que la inmunotinción frente a CB produce el marcado complementario a CyO, ya que LPMR presenta alta inmunoreactividad frente a CB, mientras que el área pretectal y el LD (Figura 70, secciones F-H). Por esto ambos marcadores químicos resultan de gran ayuda para la delimitación del LPMR.

Nuestra subdivisión del complejo LP, especialmente en relación con núcleo LPMC, muestra pequeñas diferencias con la del atlas de ratón de Franklin y Paxinos (2007) y la subdivisión de Nakamura et al. (2015), donde consideran el LPLC como parte del LPMC en base a su inmunoreactividad frente a vGluT2. Por lo que en el resto del trabajo utilizaremos nuestros esquemas sagitales de los núcleos del LP.

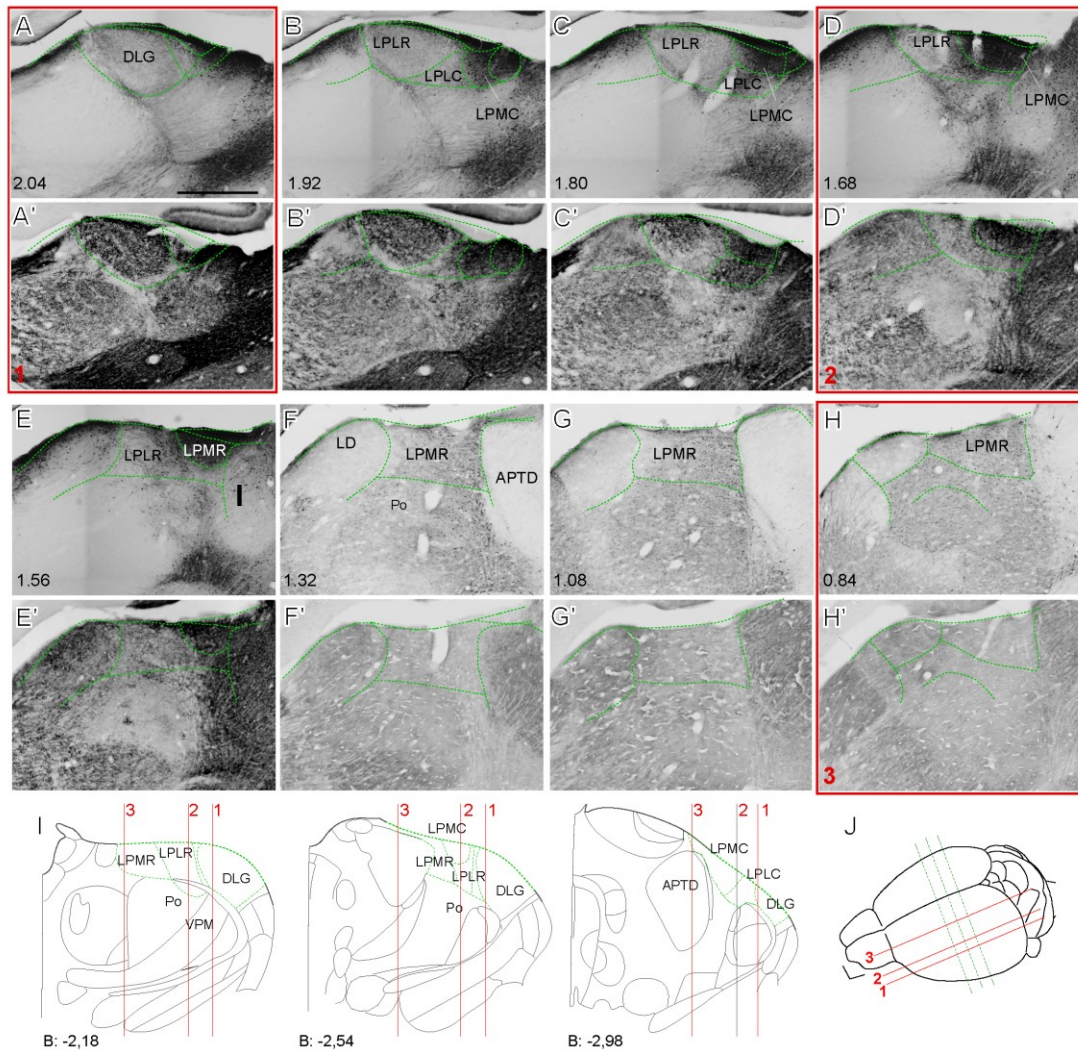


Figura 70. Delimitación de las subdivisiones del complejo LP. Microfotografías de secciones sagitales del tálamo de ratón ordenadas formando una progresión latero-medial del encéfalo. Las imágenes se corresponden con dos series (A-H y A'-H') de secciones adyacentes de dos animales distintos, es decir, un total de cuatro series en las que se llevó a cabo una inmunotinción frente a CR (A-E), vGluT2 (A'-E'), CB (F-H) y una tinción histoquímica frente a la enzima CyO (F'-H'). El nivel mediolateral correspondiente con los esquemas de Franklin y Paxinos (2007) se indica en la esquina inferior izquierda de cada sección. (I) Esquemas de cortes coronales tomados del atlas del ratón de Franklin y Paxinos (2007) donde se representa en cada uno de los tres, la posición de los cortes sagitales 1, 2, 3 correspondientes con las microfotografías superiores con los mismos números. (J) Esquema realizado de la cara dorsal del encéfalo de ratón donde aparecen dibujados los planos de corte de las secciones sagitales (rojo) y coronales (verde) anteriores. Barra de calibración de 500µm. Ver lista de abreviaturas.

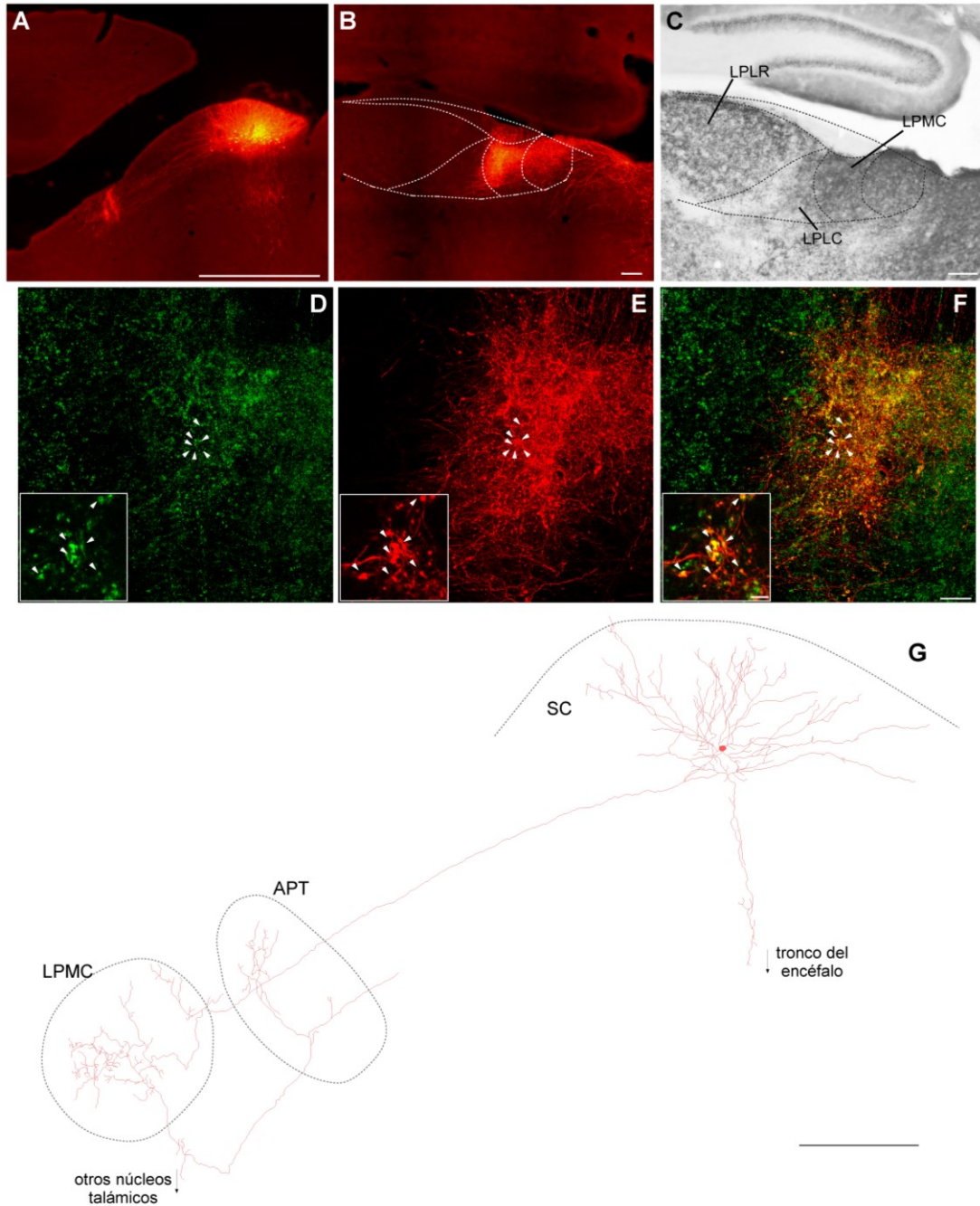


Figura 71. Proyecciones de las capas superficiales del SC (estrato gris superficial y estrato óptico) al complejo LP caudal. (A) Microfotografía del depósito de viriones AAV-GFP en SC en una sección sagital y de la salida rostralmente de los axones marcados (rojo). (B) Microfotografía de la arborización terminal axónica en el LPMC procedente del depósito anterior. (C) Tinción inmunohistoquímica frente al transportador vGluT2 en una sección sagital talámica y delimitación del LPMC en base a ella. (D-F) Microfotografías tomadas con distintos filtros en el microscopio confocal de una tinción inmunofluorescente doble frente a CR (verde, D), axones rellenos del vector AAV-GFP (rojo, E) y solapamiento de ambos marcados (F) junto a microfotografías con mayor magnificación para mostrar los somas doblemente marcados señalados con flechas blancas. (G) Reconstrucción en cámara clara de una neurona aislada obtenida de un depósito del vector AAV-GFP en el SC, donde se muestra su árbol axónico terminal en LPMC y APT. Barras de calibración de 1000µm (A), 100µm (B-C), 25µm y 10µm (D-F) y 250µm (G). Ver lista de abreviaturas.

2 ESTUDIO MEDIANTE TRAZADO RETRÓGRADO DE LA LOCALIZACIÓN DENTRO DEL dLGN Y EL COMPLEJO LP DE LAS NEURONAS QUE INERVAN LAS ÁREAS VISUALES

El mapeo detallado del sistema TC del tálamo visual requiere una descripción previa de la existencia de una topografía precisa de las proyecciones de cada uno de los núcleos que vamos a estudiar. Numerosos estudios han intentado abordar este objetivo analizando la distribución de terminales procedentes de sus principales aferencias (SC, retina y corteza), lo cual ha permitido describir la clara retinotopía existente en dLGN, pero todavía no se ha esclarecido la existencia de una topografía determinada en los tres núcleos que componen el complejo LP del ratón. A pesar de que en la bibliografía se describe una clara preferencia de los principales aferentes retinianos y coliculares por núcleos concretos del complejo LP, en nuestro análisis de distribución de aferentes coliculares al LP caudal, hemos observado que estas aferencias no muestran una organización específica en los núcleos de LP. Es por ello que estudiamos la distribución de sus eferencias en las principales áreas corticales inervadas mediante trazado retrógrado a la espera de obtener más información sobre esta posible topografía interna de los núcleos dLGN, LPL, LPMC y LPMR.

2.1 Depósitos en corteza estriada

Comenzamos realizando depósitos corticales columnares abarcando toda la extensión laminar de V1 con la finalidad de comprobar la distribución retinotópica de las neuronas TC del dLGN, así como la distribución de somas que proyectan a V1 desde los tres núcleos del LP. Se realizaron un total de 15 depósitos de trazadores retrógrados fluorescentes en V1 con éxito, sin contaminación de la sustancia blanca, para nuestro estudio. En algunos casos se extendían incluyendo parte de alguna corteza extraestriada, y finalmente escogimos 7 depósitos representativos (Figura 72, A-E) mediante los que podemos determinar fielmente la organización topográfica de los somas en dLGN sobre los esquemas de secciones sagitales que hemos redefinido.

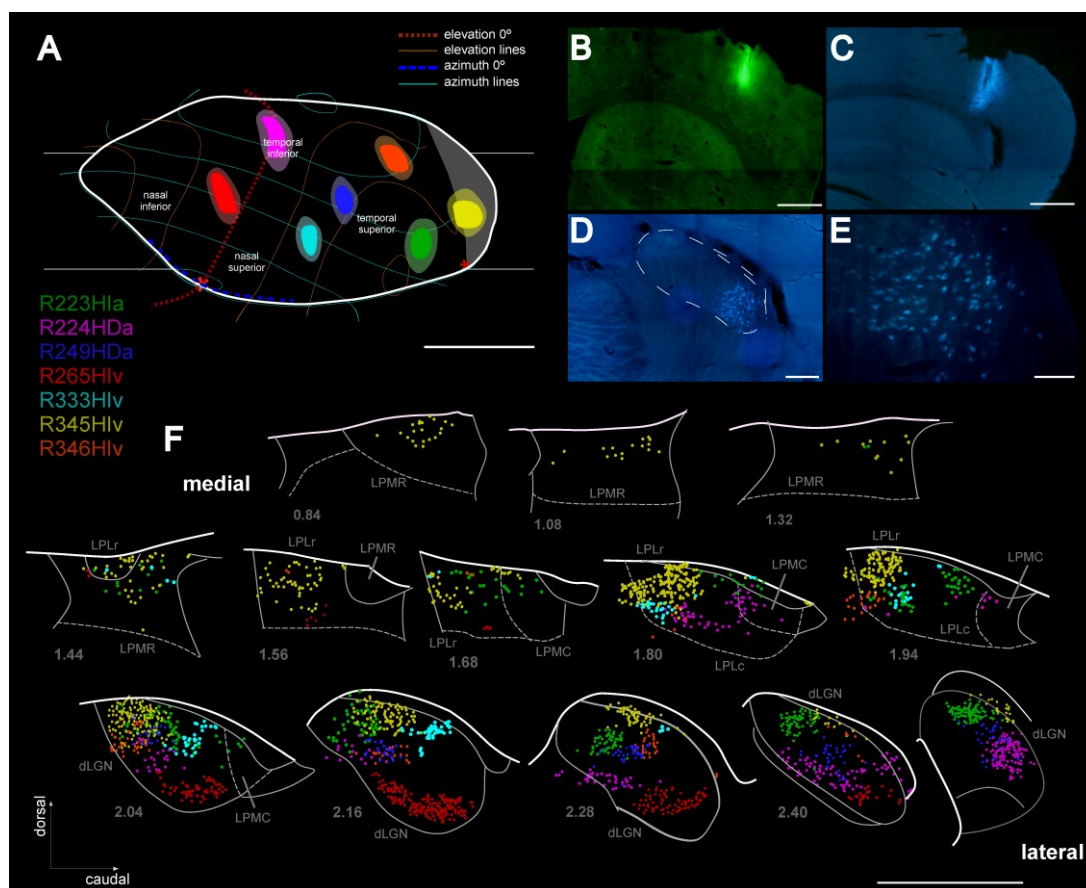


Figura 72. Resumen de los casos utilizados para el estudio de la organización topográfica del dLGN mediante experimentos de trazado retrógrado. (A) Mapa plano de V1 y las cortezas extraestriadas con una región sombreada que traza el borde occipital del encéfalo y la región que queda plegada ventralmente. Se muestran los depósitos corticales de FB, CTB-488 y CTB-594 en diversos colores rodeados por un halo que simula la región adyacente al depósito que puede estar captando moléculas de trazador por proximidad. La distribución de los depósitos corticales abarca todos los cuadrantes del campo visual representados en V1. Además se han incluido en el mapa plano varios grados de elevación y azimuth, así como tres líneas horizontales que están cruzando el mapa y se corresponden con los planos sagitales 1mm, 2mm y 3mm, respectivamente de superior a inferior. (B-E) Microfotografías de algunos de los depósitos corticales analizados (B, C), así como un ejemplo del marcaje talámico en el dLGN (D, E). (F) Esquemas sagitales talámicos redefinidos de dLGN y el complejo LP como se ha descrito en el apartado anterior. De ahora en adelante, se muestran siempre siguiendo una progresión medio-lateral, siendo el primero el más medial y hacia la derecha niveles cada vez más laterales. El complejo LP abarca los niveles medio-laterales entre 0,72 y 1,94mm, mientras de dLGN ocupa la fila inferior de esquemas, los niveles 2,04 – 2,52mm. El extremo derecho de cada sección se corresponde con la región rostral y a la izquierda, la región caudal. En estos esquemas aparecen los somas neuronales marcados con trazador en cada uno de los depósitos corticales representados en forma de puntos. Barras de calibración de 500µm (B, C), 100µm (D), 50µm (E) y 1mm (F). Ver lista de abreviaturas.

El depósito más rostral de V1 localizado en el límite entra los cuadrantes correspondientes del campo visual nasal superior y nasal inferior es el caso R265Hlv (color rojo), en el cual se aprecia una clara distribución de sus somas en las regiones más ventrales del núcleo dLGN a lo largo de todo el eje medio-lateral, especialmente en niveles centrales del núcleo (Figura 72, F). A excepción de los niveles más laterales del dLGN, en los que la región ventral va a empezar a

aparecer el vLGN. En el complejo LP, apenas aparecen somas marcados, y únicamente en la región más ventral de niveles mediales de LPL rostral.

Para terminar de cubrir la representación del campo visual inferior de mucho menor tamaño que la superior, hemos tomado el caso más lateral R224HDa (color rosa) situado en el cuadrante temporal inferior. Aquí observamos que la distribución de sus somas en la región central del núcleo es constante a lo largo del eje medio-lateral pero aumenta su proporción en niveles más laterales (2,40-2,52mm) (Figura 72). Por otro lado, en la Figura 72F observamos cómo la distribución de los somas marcado en rosa se prolonga medialmente abarcando la zona central de los núcleos LPMC y LPL rostral.

El caso más medial de V1, R333Hlv (color azul turquesa) se halla en límite entre los campos visuales nasal superior y temporal superior. La distribución de sus somas marcados en dLGN es principalmente en niveles mediales del núcleo en regiones dorsales del mismo y de forma decreciente hasta no aparecer marcado en niveles laterales (2,52mm) (Figura 72). Su distribución se continúa en niveles rostro-ventrales de LPL rostral (Figura 72F).

Para finalizar, consideramos los depósitos contenidos en la región más caudal de V1 correspondiente con el cuadrante temporal superior del campo visual, que en roedores con visión todavía lateralizada, constituye el de mayor extensión. Aquí aparecen los depósitos R249HDa (color azul oscuro), R346Hlv (color naranja), R223Hla (color verde) y R345Hlv (color amarillo); aunque este último depósito al estar localizado en la porción más caudal de V1 por debajo del polo occipital, presenta una distribución de somas ligeramente distinta. El caso R249Hda presenta una distribución de somas marcados limitada a dLGN, principalmente en sus regiones centrales a lo largo de todo el eje medio-lateral sin cambios aparentes en su densidad de somas (Figura). El caso R346Hlv presenta somas marcados en la región central-dorsal del dLGN a lo largo de todo su eje medio-lateral, apareciendo mayor densidad en niveles centrales y evitando niveles más laterales. A diferencia del caso anterior la distribución de somas se extiende abarcando regiones rostro-ventrales en niveles laterales del LPL rostral. El caso R223Hla muestra una distribución de somas en regiones centrales y rostrales a lo largo de todo el eje medio-lateral del dLGN, extendiéndose medialmente hasta alcanzar regiones dorsales de LPMC y dorso-ventrales en el LPLR (Figura 72F). Por último, el caso R345Hlv situado bajo el polo occipital de V1, es el muestra una distribución más extensa abarcando los núcleos LPL y LPMR en todo su eje medio-lateral. Dentro del dLGN sus somas se reparten mayoritariamente en niveles más mediales del núcleo, en el extremo rostral y dorsal, esta situación se continúa en LPL rostral y LPMR.

Así mismo para determinar con mayor exactitud los cambios en la distribución de somas retrógradamente marcados en el eje medio-lateral, la Figura 73 muestra la distribución de somas de cada depósito en cada uno de los niveles medio-laterales de los esquemas sagitales talámicos.

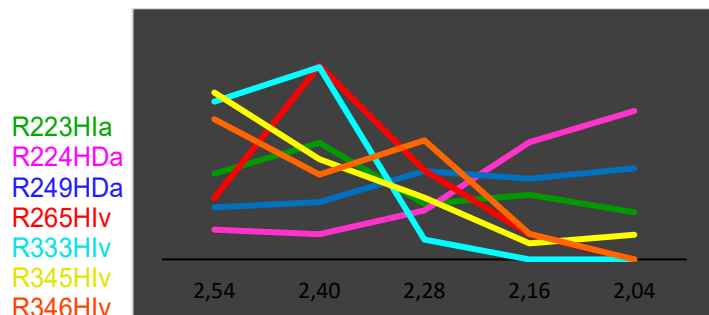


Figura 73. Distribución del porcentaje de somas retrógradamente marcados a lo largo del eje medio-lateral en cada uno de los niveles reflejados en el eje de abscisas para los casos indicados en la figura anterior.

La morfología del núcleo dLGN en roedores en forma de rodilla dificulta en ocasiones la interpretación gráfica de los resultados, por lo que se ha añadido una representación 3D de los resultados de estas inyecciones retrógradas en V1 (Figura 74). En ella observamos la progresión de los somas marcados en un plano coronal organizados formando láminas, características de la organización *shell-core* de este núcleo.

A la vista de estos resultados, se puede inferir el mapa retinotópicamente organizado en el que se distribuyen las neuronas TC en el dLGN (Figura 74). Con respecto al complejo LP, a excepción del núcleo LPL, no parece existir una organización topográfica determinada en LPMR y LPMC. En los casos seleccionados apenas aparece marcado retrógrado en la región caudal del LPL, pero en su región rostral grupos focales de somas neuronales marcados con varios de los depósitos corticales. A pesar de ello, no se ha conseguido distinguir un patrón de distribución congruente entre las poblaciones neuronales que proyectan a V1 desde LPL en base a su marcado retrógrado.

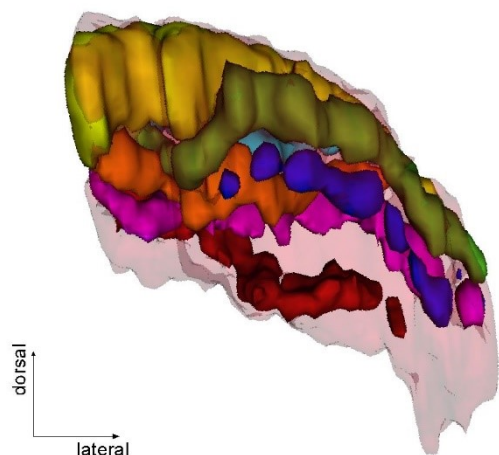


Figura 74. Representación esquemática de los somas marcados retrógradamente, tras los depósitos de trazadores en V1 descritos en la figura anterior, contenidos en un volumen tridimensional para su visualización de su patrón de distribución en el plano coronal. Se ha conservado el mismo código de colores para representar el marcado que en la figura anterior.

2.2 Depósitos en cortezas extraestriadas laterales

El siguiente paso considerado para definir la posible existencia de una organización topográfica en los núcleos LPL, LPMC y LPMR ha sido la realización de depósitos retrógrados en las 10 áreas corticales que conforman la corteza visual extraestriada en el ratón, junto a las dos áreas propuestas (V2Loc y V2MMoc) a expensas de una delimitación más precisa de las áreas extraestriadas localizadas caudalmente al polo occipital. Existe todavía gran controversia sobre la jerarquía de estas áreas visuales y su implicación en las corrientes de procesamiento de la información visual ventral o dorsal (Wang et al. 2012), por lo que para describir los resultados del trazado retrógrado en estas áreas se han dividido inicialmente en laterales o mediales a V1.

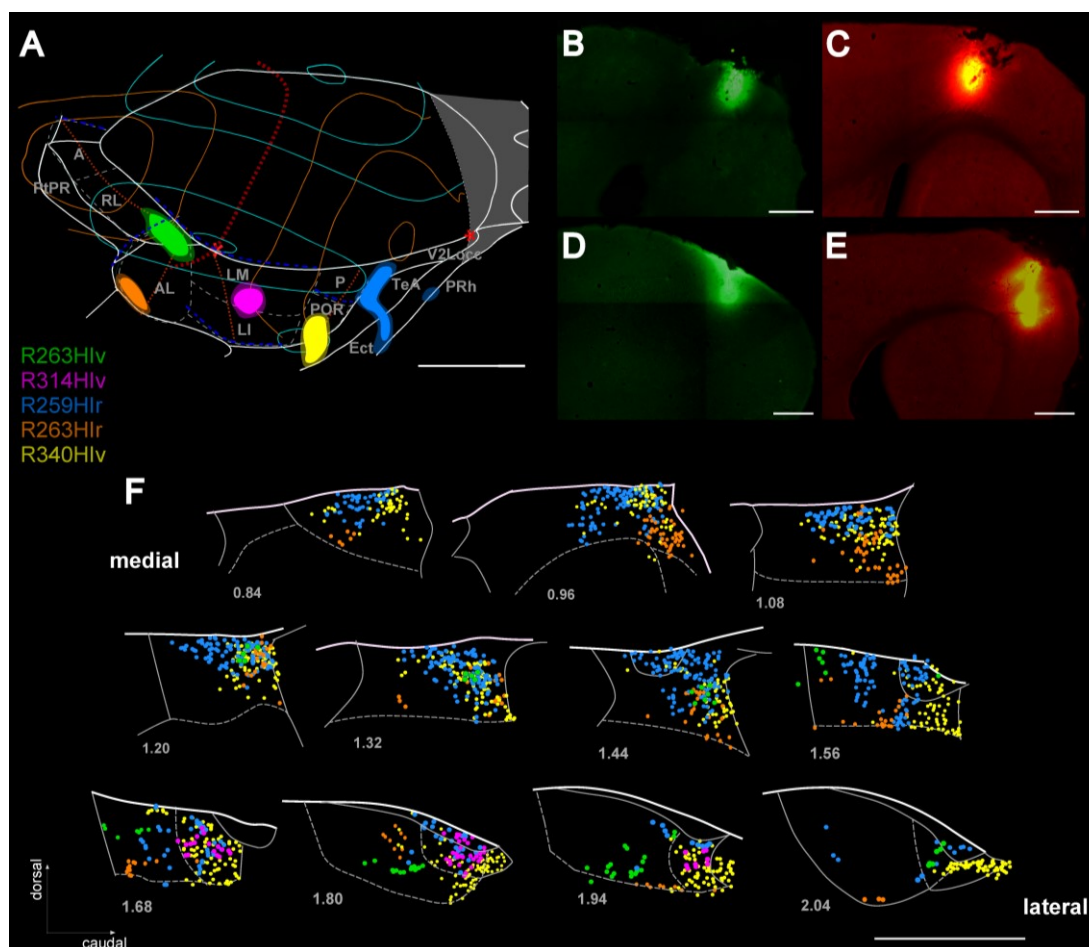
En las áreas laterales a V1 (LM, LI, P, POR, AL y RL) se han realizado un total de 16 depósitos, de los cuales hemos seleccionado 5, en los que el depósito queda completamente restringido a estas áreas y sin contaminación de sustancia blanca, para describir el tipo de distribución en el complejo LP que presentan estas neuronas TC (Figura 75, A-E).

Como se precisa en la introducción, el área LM se ha considerado en base a su conectividad homóloga y análoga al área V2 de primates, así como el área LI homóloga a V3. El caso R314Hlv (color rosa) se trata de un depósito cortical de muy pequeño tamaño localizado en el límite de estas dos áreas, aunque se extiende más en LI. En este caso observamos que los somas marcados retrógradamente se sitúan principalmente en toda la extensión del núcleo LPMC, y de forma escasa en LPL caudal (Figura 75F).

Los depósitos corticales R340Hlv (color amarillo) y R259Hlr (color azul) se encuentran situados en áreas visuales extraestriadas laterales (P, POR-Ect). Estas áreas se han propuesto como parte de la corriente ventral de procesamiento de la información visual por su alta conectividad con cortezas temporales y parahipocampales. En estos casos observamos una distribución de somas marcados particularmente densa en todo el volumen del núcleo LPMC (especialmente el caso R340Hlv), que parece constituir la principal aferencia a éstas áreas corticales. Así mismo, se aprecia gran cantidad de somas marcados de forma más dispersa en la región caudal del LPMR a lo largo de todo su eje medio-lateral, el caso R259Hlr muestra una distribución ligeramente más dorsal y el caso R340Hlv ventral (Figura 75F).

Los casos R263Hlv (color verde) y R263Hlr (color naranja) van a extenderse en las áreas corticales AL y RL, que se han sugerido como nodos de la corriente dorsal de procesamiento de la información visual. El caso R263Hlv abarca parte de la corteza parietal posterior dorsal (PPtD)

o área RL, y el caso R263Hlr muestra una pequeña contaminación en S2. La distribución de somas retrógradamente marcados abarca los núcleos LPL y LPMR. Dentro de LPL aparecen somas en niveles laterales en posición ventral y a medida que progresamos hacia niveles más mediales, los somas se desplazan dorso-rostralmente, pudiendo intuirse una topografía. En el núcleo LPMR, la distribución de somas, como en el resto de casos, es mucho más dispersa y solapada en este núcleo, aunque parecen ocupar su región caudal a lo largo de todo su eje medio-lateral (Figura 75F).



2.3 Depósitos en cortezas extraestriadas dorsales y mediales

En las áreas visuales extraestriadas localizadas medialmente a V1 (A, AM, PM, MM, V2MMocc) realizamos un total de 11 depósitos con transporte retrógrado completo. Del total hemos escogido 3 representativos en los que las inyecciones eran más limitadas a áreas visuales y así arrojaban una información más clara de su distribución en los núcleos del tálamo visual (Figura 76A). Todas las áreas situadas medialmente a V1 se han propuesto como componentes de la corriente dorsal de procesamiento de la información visual (Wang et al. 2012).

En primer lugar analizaremos el depósito cortical de mayor extensión, el caso R304H1a (color rosa claro), situado en las proximidades del polo occipital en niveles encefálicos muy mediales. Esta localización tan caudal, posterior al esplenio del cuerpo calloso, en cortezas visuales asociativas mediales y retroesplénicas (RSD/RSG) de bajo grosor favorece en muchos casos la contaminación del área cortical directamente ventral, como ha sido el caso de este depósito (Figura 76, A-D). Por ello este depósito abarca las áreas visuales extraestriadas PM y MM, así como una pequeña región de la representación del campo visual temporal superior en V1 y de la corteza retroesplénica granular (RSG). Al contemplar la distribución de los somas marcados con este depósito en los esquemas talámicos sagitales, vemos que su situación se restringe a regiones rostrales de los núcleos LPL y LPMR. El número de somas es mucho mayor en LPMR, especialmente en su parte medial, mientras que en son muy escasos y aparecen sólo en la región limitante con LPMR. A diferencia de otros depósitos corticales en áreas extraestriadas, éste nos muestra una gran densidad de somas marcados en dLGN, siguiendo una progresión desde el extremo caudo-ventral en niveles laterales del núcleo al extremo rostro-dorsal en niveles mediales, como trazando un eje lineal que atravesara el volumen completo del dLGN (Figura 76E).

El depósito R345H1a (color morado) localizado en el límite entre las MM y la corteza retroesplénica disgranular (RSD) va a producir un patrón de somas marcados en la región rostral de los núcleos LPL y LPMR similar a la descrita en el caso anterior. Además, el marcado es también más denso en LPMR que en LPL, ya que las dos áreas corticales implicadas en el depósito son altamente asociativas, ya sean visuales (MM) o multimodales (RSD).

Por último, el depósito R343Hiv (color azul turquesa), de pequeño tamaño, va a situarse abarcando las áreas: parietal lateral (LPtA) y AM. La distribución de sus somas retrógradamente marcados se limita al núcleo LPMR en todo su volumen sin una región preferente (Figura 76E).

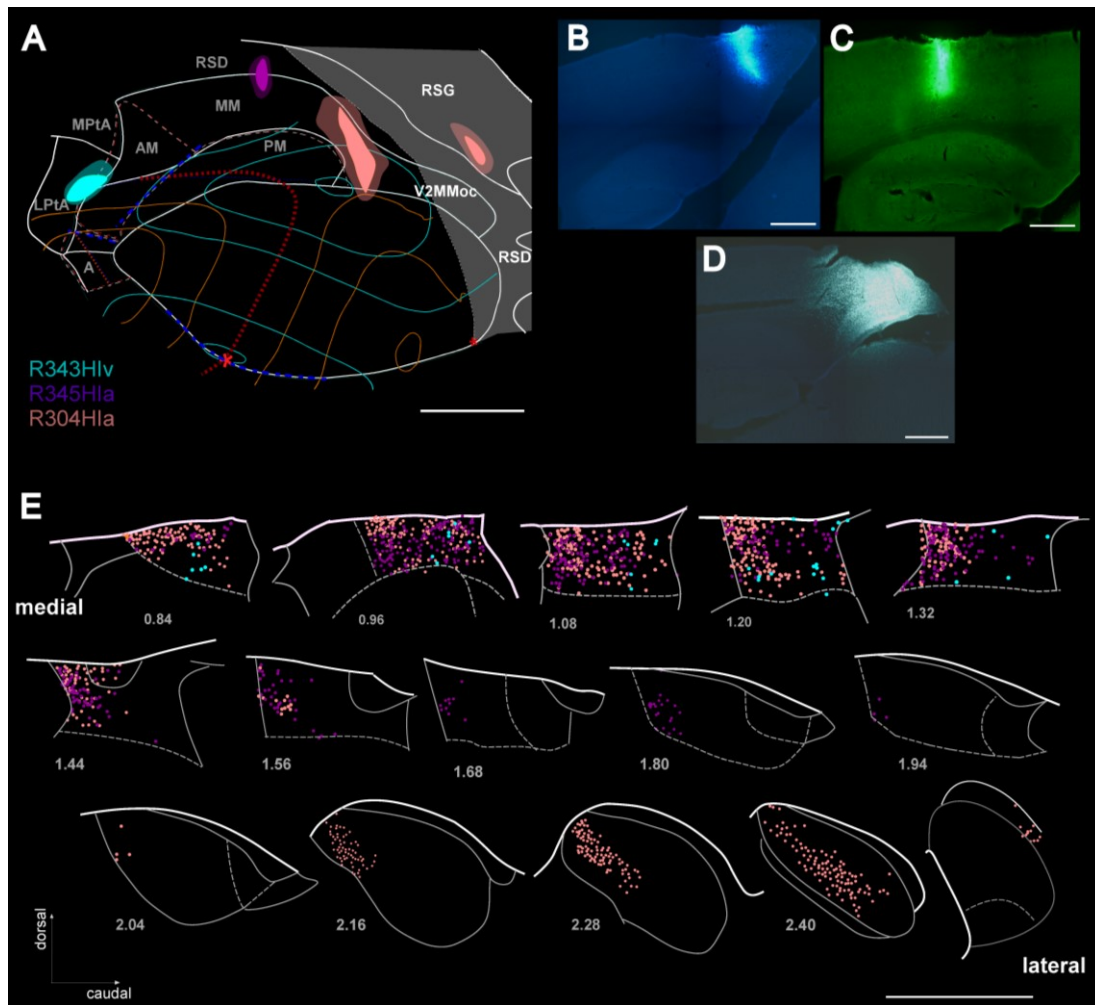


Figura 76. Resumen de los casos utilizados para el estudio de la organización topográfica del dLGN mediante experimentos de trazado retrógrado. (A) Mapa plano de V1 y las cortezas extraestriadas con una región sombreada que traza el borde occipital del encéfalo y la región que queda plegada ventralmente. Se muestran los depósitos corticales de FB, CTB-488 y CTB-594 en diversos colores rodeados por un halo que simula la región adyacente al depósito que puede estar captando moléculas de trazador por proximidad. La distribución de los depósitos corticales abarca todos los cuadrantes del campo visual representados en V1. (B-E) Microfotografías de algunos de los depósitos corticales analizados (B, C), así como un ejemplo del marcaje talámico en el dLGN (D, E). (F) Esquemas sagitales talámicos redefinidos de dLGN y el complejo LP como se ha descrito en el apartado anterior. De ahora en adelante, se muestran siempre siguiendo una progresión medio-lateral, siendo el primero el más medial y hacia la derecha niveles cada vez más laterales. El complejo LP abarca los niveles medio-laterales entre 0,72 y 1,94mm, mientras de dLGN ocupa la fila inferior de esquemas, los niveles 2,04-2,52mm. En estos esquemas aparecen los somas neuronales marcados con trazador en cada uno de los depósitos corticales representados en forma de puntos. Barras de calibración de 500µm (B, C), 100µm (D), 50µm (E) y 1mm (F). Ver lista de abreviaturas.

En base al estudio de todos nuestros casos de marcado retrógrado en áreas visuales extraestriadas, podemos inferir la existencia de una cierta topografía en el núcleo LPL, así como la ausencia de la misma en los núcleos LPMC y LPMR. Aunque sí en LPMR aparece cierta distribución preferente de los somas que proyectan hacia áreas extraestriadas laterales situándose en regiones caudales del núcleo y los que proyectan hacia áreas mediales situándose en la porción rostral del LPMR. Dentro del núcleo LPL se observa una topografía un tanto más marcada que sugiere que las neuronas TC que proyectan a las áreas visuales implicadas en la

corriente dorsal van a situarse principalmente en la porción rostral del núcleo, mientras que a las áreas extraestriadas laterales van a proyectar en su mayoría neuronas localizadas en la porción caudal del LPL (Figura 76).

3 MAPEO SISTEMÁTICO MEDIANTE TRAZADO ANTERÓGRADO POBLACIONAL DE LAS PROYECCIONES CORTICALES Y SUBCORTICALES DE LAS NEURONAS DEL dLGN Y DEL LP

Las técnicas de trazado retrógrado ayudan en gran parte a delimitar regiones dentro de un núcleo en base a su hodología a grandes rasgos, pero son las técnicas precisas de trazado anterógrado de vías neuronales a nivel micropoblacional las que nos permiten mapear la totalidad de las proyecciones de cada uno de nuestros núcleos objeto de este estudio. Para ello, seleccionamos el BDA y los vectores adenoasociados unidos a un GFP reportero, que tras infectar una neurona producen las copias suficientes de su genoma hasta rellenar la totalidad de la célula, facilitándonos la visualización de los terminales axónicos más alejados del soma, así como de las arborizaciones axónicas más profusamente ramificadas. A continuación, describimos la colección de depósitos de trazadores anterógrados perteneciente a los núcleos dLGN, LPL, LPMC y LPMR, y analizaremos en detalle la distribución subcortical y cortical de sus proyecciones en cada caso.

3.1 Análisis de la distribución cortical de las neuronas de proyección del dLGN

Para el estudio de las proyecciones TC originadas en el núcleo dLGN seleccionamos 14 depósitos micropoblacionales restringidos en su mayoría a los límites citoarquitectónicos de este núcleo. En la Figura 77 se muestra la localización del centro de la inyección en el total de depósitos talámicos analizados. En todos los encéfalos portadores de depósitos de trazadores anterógrados se ha realizado un corte seriado en el plano sagital con la única excepción de tres casos iniciales que fueron cortados en el plano coronal. Gracias a la visualización tridimensional de las inyecciones se han analizado y representado en sagital para unificar el análisis. Así en la figura se puede observar el pequeño tamaño de las inyecciones que favorece en la visualización

de la fuerte retinotopía que posee este núcleo en sus proyecciones TC. Esto queda reflejado en el anexo 1 que recoge los mapas de la superficie cortical donde se muestra tanto la extensión tangencial como radial, identificando las capas de máxima proyección, para cada uno de los depósitos analizados.

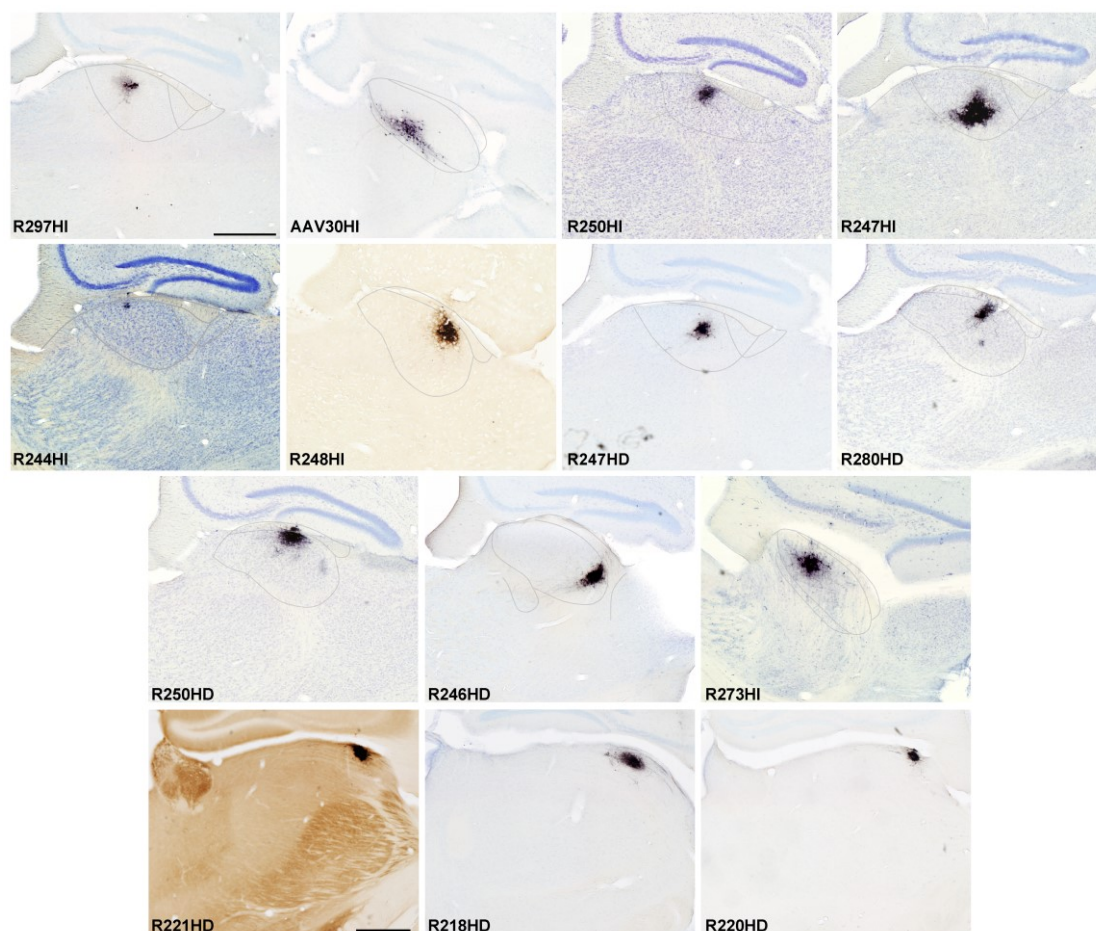


Figura 77. Resumen de los depósitos de trazadores anterógrados, BDA y AAV-GFP, en dLGN analizados en este trabajo. En los que se indica la localización del centro de la inyección dentro del núcleo dLGN. En todos los casos se muestran secciones sagitales del tálamo de ratón, a excepción de los tres depósitos situados en la última fila que se cortaron en el plano coronal. La distribución de las proyecciones TC de estos casos se recoge en el anexo 1. Barras de calibración de 500µm.

Para el estudio de la organización retinotópica de las proyecciones del dLGN visualizada en el plano sagital, se ha incluido en las secciones sagitales, que habíamos delimitado previamente en el primer apartado de resultados, algunos rasgos característicos de este núcleo ampliamente descritos en la bibliografía como la región de terminación de las aferencias de la retina ipsilateral, o las regiones correspondientes con el campo visual mono- y binocular (Coleman et al. 2009) (Figura 78,B). De todos los casos considerados hemos seleccionado seis que han sido representados en la Figura 78. El motivo para su selección fue que su arborización terminal en corteza se correspondiera con cada uno de los cuadrantes del campo visual representados en el mapa plano cortical con el fin de observar con mayor claridad esta disposición topográfica de

las poblaciones neuronales en el dLGN. En un análisis tangencial de las proyecciones TC vemos que los depósitos localizados en regiones laterales del núcleo (R273HI y AAV30HI) proyectan a regiones de V1 más mediales, mientras que los casos localizados en la porción medial (R248HI y R244HI) envían sus proyecciones a la región lateral de V1 que se corresponden con la representación del campo visual superior. Esta misma situación de inversión de lados se da entre la región rostral y caudal del dLGN, el depósito situado más caudal del núcleo (R246HI) envía sus axones hacia la porción rostral de V1 que se corresponde con el campo visual nasal inferior. Por último, el árbol axónico terminal localizado en la parte central de V1 procede de un depósito localizado en la parte central del dLGN en el eje medio-lateral pero desviado a la parte dorsal del núcleo, esto es debido a la morfología en forma de rodilla de este núcleo que al estar cortado en el plano sagital dificulta la visualización, y además a la disposición laminar de sus poblaciones neuronales como hemos observado tras el análisis del marcado retrógrado.

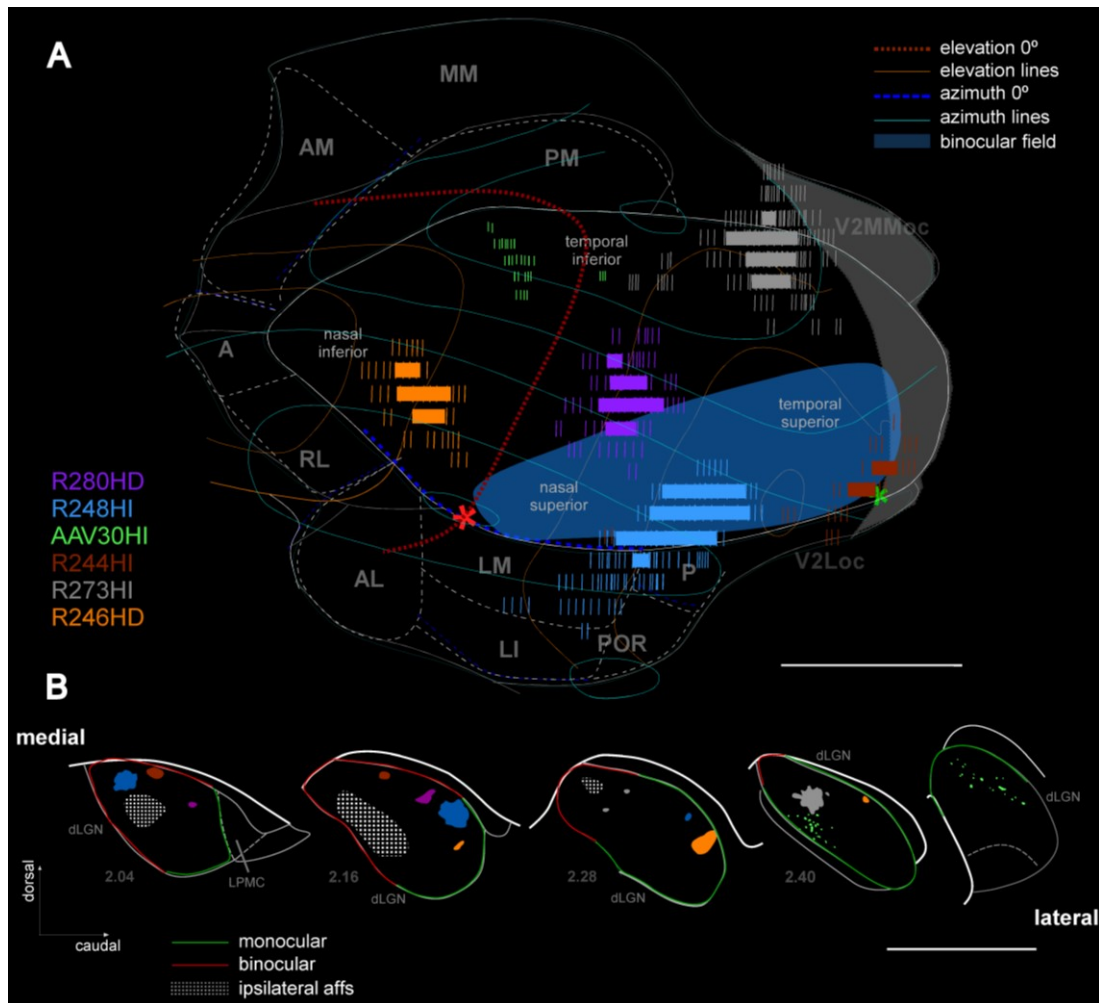


Figura 78. Distribución de las proyecciones TC de 6 depósitos representativos de BDA y AAV-GFP limitados al dLGN. (A) Mapa plano de la superficie de la corteza visual estriada donde aparecen los 6 focos de proyección de los depósitos analizados con color correspondiente al número del caso indicado en el extremo inferior izquierdo. En todos los mapas planos, la frecuencia de barras indica la intensidad del marcado, los casos en los que aparece una barra maciza representan el foco de la proyección. En el mapa se observa con un asterisco verde el polo occipital y con un asterisco en rojo el punto de intersección entre azimuth 0° y elevación 0°. Así mismo, como se indica en la leyenda situada en la esquina superior derecha, se han añadido varios grados de elevación y azimuth para facilitar la localización de las proyecciones en el campo visual. También se ha añadido la región de V1 correspondiente con el campo binocular en base a la bibliografía consultada. (B) Representación de los depósitos dentro del dLGN sobre nuestros esquemas talámicos sagitales en una progresión medio-lateral. En este caso, se han modificado estos esquemas sagitales para incluir datos relevantes para la localización de los depósitos en el campo visual. Como muestra la leyenda situada en la parte inferior izquierda, se representa el contorno de las porciones monocular y binocular descritas en dLGN, así como la región de aferencias ipsilaterales (Coleman et al. 2009). Barras de calibración 1mm (A, B). Ver lista de abreviaturas.

Como figura en la relación de casos de marcado anterógrado desde el dLGN en el anexo 1, las principales proyecciones de este núcleo son a las áreas V1 y en menor medida a las áreas extraestriadas LM, V2Loc y V2MMoc. En la Figura 79 se describe cualitativamente el patrón laminar de proyección estas áreas en un código de colores que mantendremos a lo largo de todo el trabajo para identificar las distintas láminas corticales dentro de un área determinada: capas superficiales (morado), capas intermedias (verde) y capas profundas (naranja). Así los axones

terminales en V1 se concentran en las capas 3-4 y de forma muy escasa en 1, mientras que en áreas extraestriadas terminan únicamente en capa 1 (Figura 79). A pesar de la calidad del marcado axónico proporcionada por los trazadores seleccionados, el tamaño de las poblaciones neuronales marcadas es tan pequeño que, a excepción de los árboles tan profusamente ramificados que dejan los axones en las capas 3-4, es difícil la visualización de los terminales en el resto de capas y áreas en microfotografías a de poco aumento. Esto sucede de igual forma en las proyecciones de los núcleos del complejo LP. Antes de finalizar la descripción del patrón laminar, hay que señalar en base a algunos casos del anexo 1 (R250HI, R250HD, R247HI) que a aparición de terminales en capas profundas, principalmente en capa 5, coincide únicamente con los casos en los que el depósito contamina LPL por lo que este marcado es probablemente debido a ello.

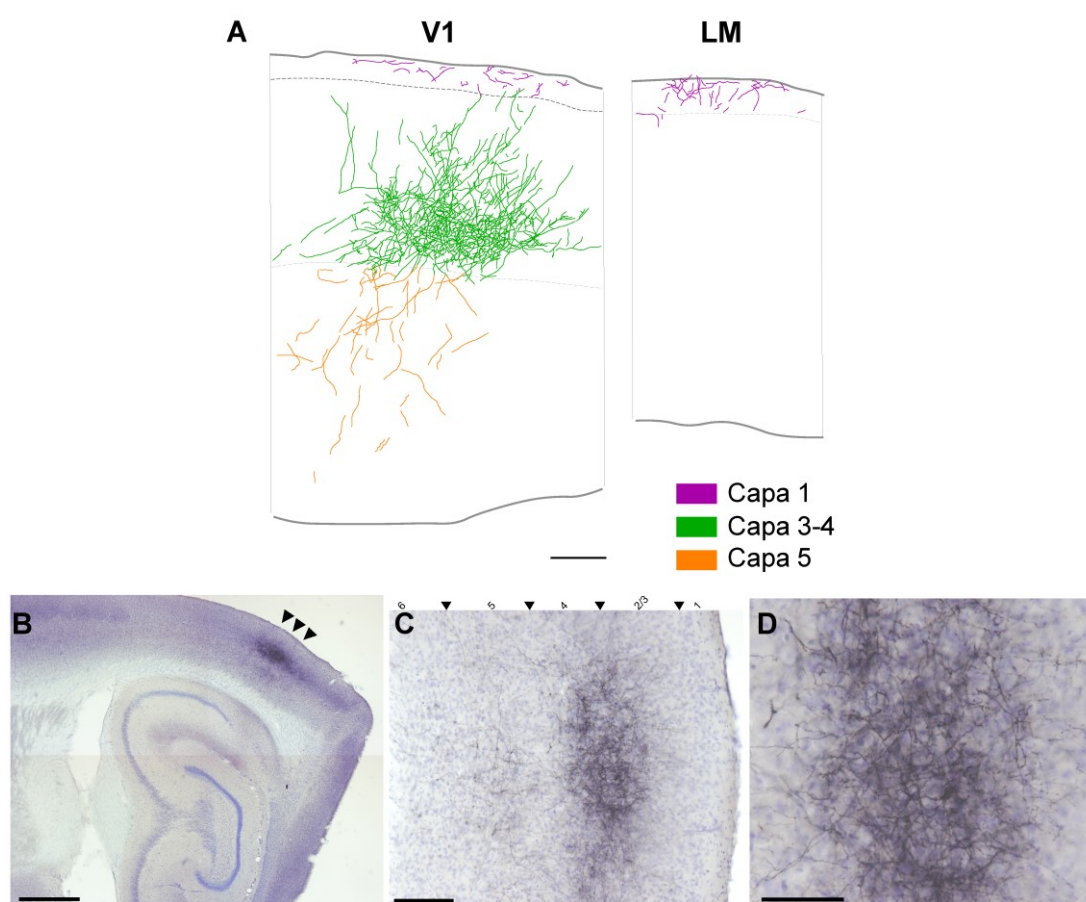


Figura 79. Distribución de los terminales axónicos TC radialmente en las distintas láminas corticales procedentes de los depósitos anterógrados localizados en el núcleo dLGN descritos en la figura anterior. (A) Dibujos bajo cámara clara de secciones sagitales mostrando el patrón laminar de estos depósitos en las áreas estriada y extraestriada, distribuyéndose en capas superficiales (1), intermedias (3-4) y profundas (5-6). En este caso, al igual que en el resto de depósitos de trazadores anterógrados BDA y AAV-GFP la distribución laminar se representa con un color específico y constante para cada capa de máxima inervación como indica la leyenda situada en la parte inferior. (B, C) Microfotografías de secciones sagitales donde se muestra la profusa proyección TC del dLGN a capas intermedias de V1. (D) Detalle de los terminales axónicos en capa 4 cortical. Barras de calibración de 50µm (A), 500µm (B) y 50µm (C, D). Ver lista de abreviaturas.

Por último, en la Tabla 12 se recoge un resumen de la distribución tangencial o areal descrita a nivel cualitativo utilizando un código de colores de intensidad progresiva de gris en función del hallazgo de mayor densidad de terminales axónicos varicosos, que utilizaremos para cada uno de los núcleos estudiados. En este punto, es conveniente definir los criterios de estos tres niveles de densidad de marcado utilizados, considerando en todo momento el gran componente subjetivo que poseen. Alta densidad se corresponde con el plexo intracortical que forman los terminales de las neuronas de dLGN en la capa 3-4 de V1 (Figura 79); densidad media se corresponde con los campos terminales en capa 5 de V1 de las neuronas de los núcleos del complejo LP (Figura 82 y 86); densidad baja aparece, por ejemplo, en capa 1 de áreas temporales da algunas poblaciones del LPL (Figura 82) o en capa 1 de cortezas frontales inervadas por neuronas del LPMR (Figura 90); mientras que en los casos que aparecen menos de 10 terminales axónicos claramente varicosos, ya que nunca se consideran las fibras de paso, lo denominaremos axones aislados (señalizados con un asterisco, *).

Tabla 12. Resumen de la distribución tangencial de los axones TC marcados con los depósitos de BDA y AAV-GFP en dLGN que hemos analizado en este trabajo. La escala de grises indica la densidad relativa de inervación observada para cada uno de los depósitos. Los asteriscos negros indican la presencia ocasional de axones aislados que no forman un campo terminal definido. Los casos marcados en gris son los descritos en la Figura 78. Ver lista de abreviaturas.

Caso	V1	LM	AL	LI	RL	A	AM	MM	PM	P	POR	V2L _{oc}	V2MM _{oc}
R218HD		*											
R220HD													*
R221HD													
R247HI													
R246HD													
R247HD													
R250HI		*										*	
R250HD		*										*	
R273HI													
R280HD													
R244HI												*	
R248HI										*			
R297HI													
AAV30HI													

Densidad alta
 Densidad media
 Densidad baja

3.2 Análisis de la distribución subcortical y cortical de las neuronas de proyección del LPL

A continuación, pasamos a estudiar el sistema de proyección TC en el complejo LP, que incluye los núcleos delimitados de forma precisa previamente sobre secciones sagitales: LPL,

LPMC y LPMR. Se consideraron un total de 8 depósitos de diversos tamaños restringidos en su mayor parte al núcleo LPL, entre los que figuran inyecciones de BDA y del vector viral AAV-GFP (Figura 80). El análisis de la distribución tangencial y radial de estas proyecciones TC sobre mapas de la superficie cortical de la totalidad de los casos que incluimos en este trabajo, se recoge en el anexo 2. Es necesario señalar en este punto, el pequeño tamaño de los núcleos que forman el complejo LP en relación al volumen talámico total, lo que dificulta en gran medida la obtención de microdepósitos contenidos completamente en uno sólo de estos tres núcleos. Es por ello, que cuando observamos la distribución de terminales axónicos areal o laminar hay que considerar si existe contaminación del depósito y qué núcleo talámico adyacente se está viendo afectado, para la interpretación correcta de los resultados que describimos a continuación.

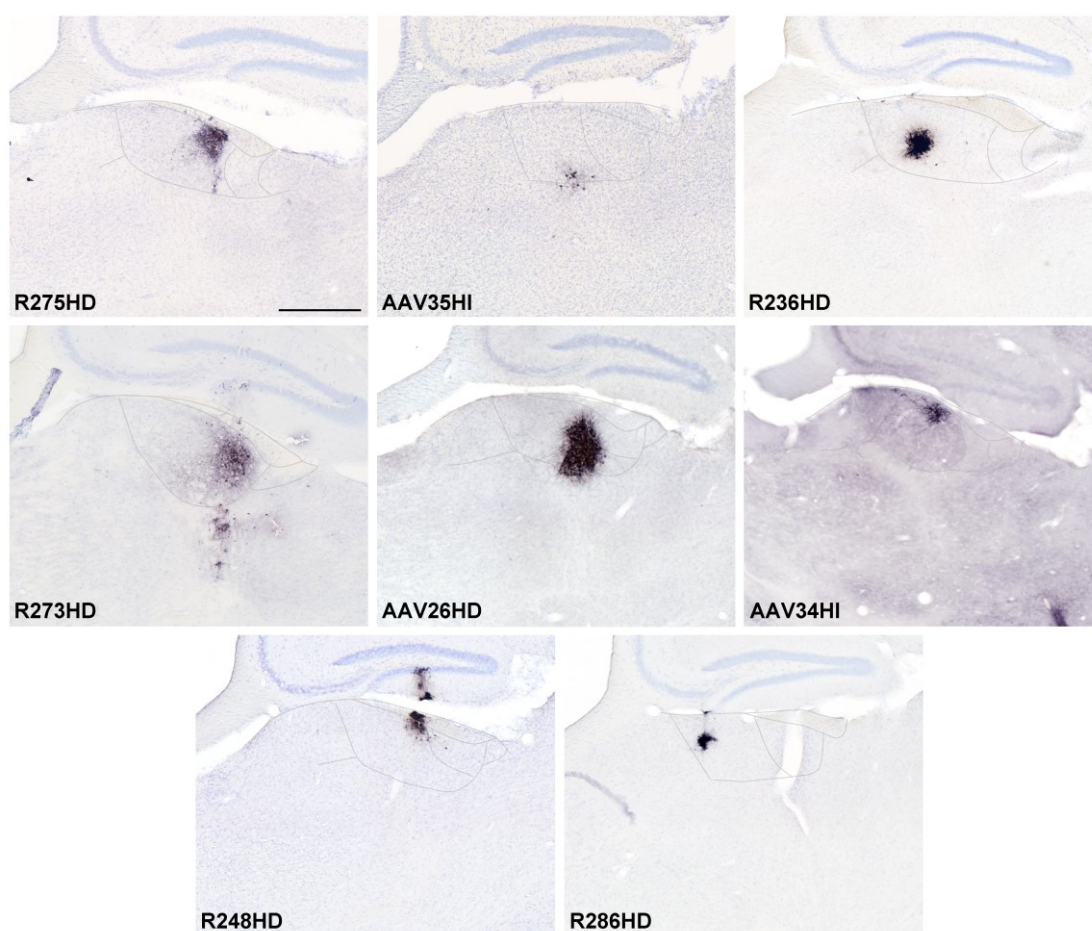


Figura 80. Colección de los depósitos de trazadores anterógrados (BDA y AAV-GFP) en LPL que incluye este trabajo, mostrados en secciones sagitales de ratón. En los que se indica la localización del centro de la inyección dentro del núcleo LPL. Los mapas planos del marcado cortical correspondiente a la totalidad de estas inyecciones se recogen en el anexo 2. Barra de calibración de 500μm.

Para el estudio detallado de estas proyecciones y la detección de una posible topografía específica en este núcleo hemos considerado tres microinyecciones modelo. Para escoger estos casos nos hemos utilizado como criterios que se situaran en las porciones lateral (caso AAV34HI),

central (R248HD) y medial (R286HD) del núcleo con la finalidad de revelar la existencia de una distribución areal diferente. En la Figura 81 se muestra un mapa plano de la superficie cortical que incluye la distribución TC de estos tres casos, mostrando un patrón de proyección bastante diferente aunque en algunas regiones solape. A pesar de ello, es posible intuir una determinada topografía en las proyecciones de LPL aunque no tan marcada como en el caso del dLGN. Se observa que la parte caudo-lateral del núcleo proyecta preferentemente a las áreas extraestriadas situadas lateralmente a V1 de manera más profusa (LM, P, V2Loc, AL, RL, A). Mientras que los depósitos situados en la porción rostro-medial del LPL muestran mayor densidad de terminales axónicos en las áreas visuales asociativas dispuestas medialmente a V1 (PM, V2MMoc, AM, MM).

En general, el patrón de proyecciones TC de este núcleo que restringido principalmente al cinturón áreas visuales asociativas que rodea V1, intervando en todos los casos más de una. Aunque en algunos casos puede abarcar la corteza visual primaria, así como áreas temporales (TeA), parietales (LPtA, PPtR) y retrospleniales (RSD, RSG) como queda reflejado en la Tabla 13.

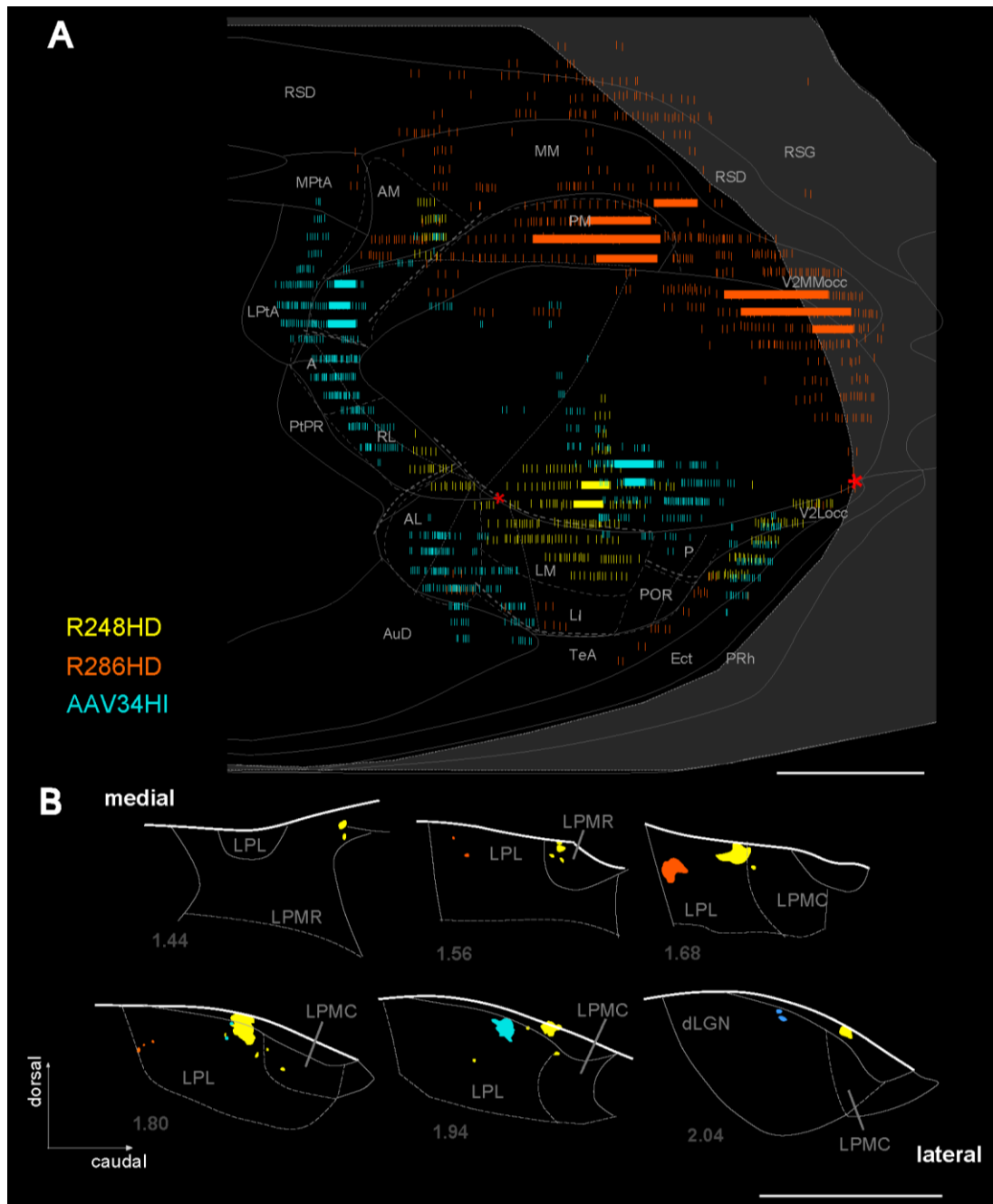


Figura 81. Representación de la distribución de las proyecciones TC de 3 depósitos representativos de trazadores anterógrados limitados al LPL. (A) Mapa plano de la superficie cortical donde aparecen los terminales axónicos de los 3 depósitos analizados con color correspondiente al número del caso indicado, representando su extensión tangencial, pero sin distinguir su distribución en las distintas láminas corticales. Para observar esta distribución radial de cada depósito ver anexo 2. (B) Representación de los depósitos dentro del complejo LP en los esquemas talámicos sagitales siguiendo una progresión medio-lateral, donde se aprecian el tamaño y distancia entre las mismas. Barras de calibración de 1mm (A, B). Ver lista de abreviaturas.

En el caso de la distribución laminar, la carencia de campos terminales de axones TC realmente profusos en comparación con los del dLGN en V1, dificulta la visualización de los mismos sobre microfotografías directamente. Por ello, en la Figura 82 se muestran dibujos bajo cámara clara de la distribución laminar de los terminales TC procedentes de micropoblaciones

del núcleo LPL que presentan la mínima contaminación de otros núcleos adyacentes. Se observa que el patrón de terminación en áreas primarias como V1 es preferentemente a capa 1 y 5. Mientras que en la mayoría de áreas visuales asociativas las arborizaciones terminales ocupan las láminas corticales superficiales (1) e intermedias (3-4) como en las áreas AM, PM, V2MMoc, RL, A y AL. En otros casos únicamente la capa 1 o las capas 3-4 como sucede en MM, LI y V2Loc. Por el contrario, en los casos en los que los axones alcanzan áreas fuera de la corteza visual suelen terminar preferentemente en la capa 1 como en RSG o Ect, aunque siempre hay excepciones como terminar en capas superficiales e intermedias (RSD, TeA) o superficiales y profundas (LPtA).

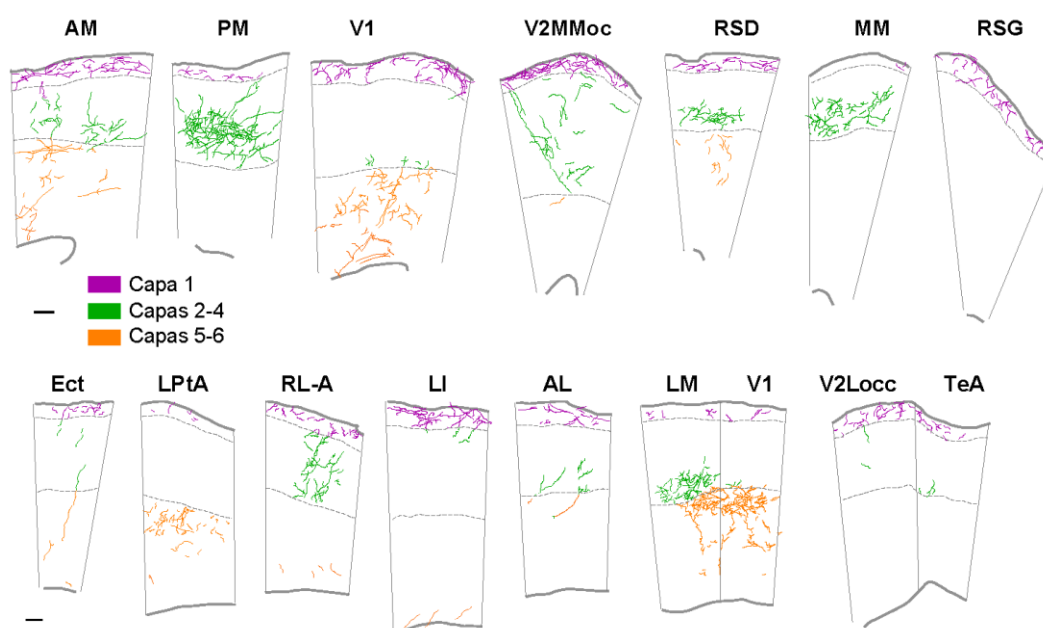


Figura 82. Representación esquemática del patrón laminar general en las áreas de máxima proyección de los depósitos de trazador anterógrado en LPL. En estos dibujos bajo cámara clara de secciones sagitales se indican la distribución por capas de los árboles axónicos terminales en cada una de estas áreas corticales en distinto color, como queda indicado en la leyenda. Barra de calibración de 50µm. Ver lista de abreviaturas.

Las neuronas localizadas en el núcleo LPL en muchos casos, señalados en la Tabla 13, van a emitir proyecciones axónicas en su camino hacia la corteza cerebral en el estriado formando pequeños campos terminales localizados principalmente en regiones dorsolaterales y caudales del Str. La Figura 83 recoge las proyecciones subcorticales de los casos AAV26HI (verde) y R275HD (azul).

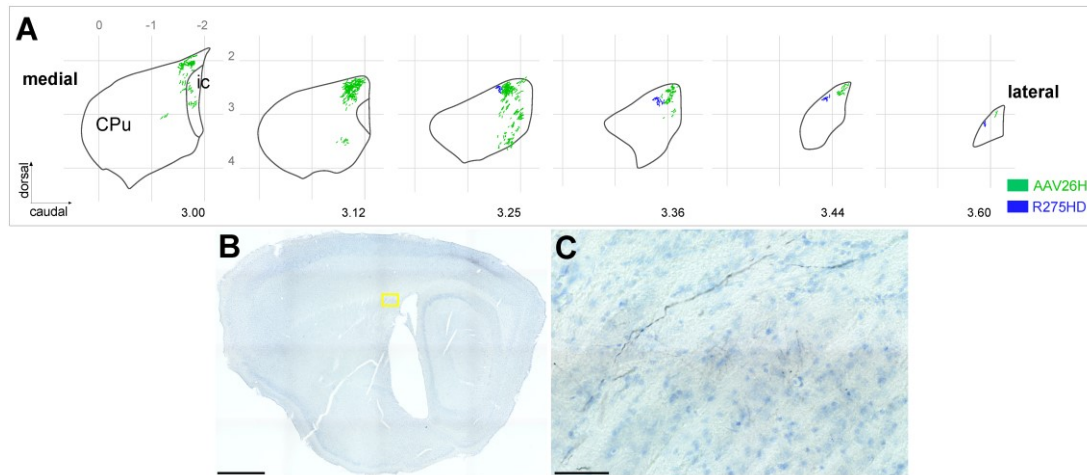


Figura 83. Distribución de la innervación estriatal en dos depósitos de trazadores anterógrados localizados en LPL. (A) Representación en secciones sagitales modelo del estriado de ratón de los terminales varicosos procedentes de dos poblaciones neuronales situadas en el núcleo LPL dibujados bajo cámara clara. La ubicación de los dos depósitos correspondientes se indica en la Figura 80. Cada sección modelo procedente del atlas Paxinos y Franklin (2008) se ha identificado con por su coordenada mediolateral (en mm) y con varios planos coronales y horizontales como referencia de posición y escala. (B) Microfotografía de una sección sagital donde hemos observado marcado en el estriado. (C) Detalle de las varicosidades axónicas localizadas en la región de estriado señalada sobre la fotografía B con un recuadro amarillo. Barras de calibración de 1000 μ m (B) y 50 μ m (C). Ver lista de abreviaturas.

Tabla 13. Representación cualitativa de la distribución tangencial de los axones TC marcados de cada uno de los depósitos anterógrados analizados del núcleo LPL. En la tabla se muestra en una escala de intensidad de grises que se corresponde directamente con la densidad de campos terminales observada en cada área cortical concreta. Los asteriscos negros indican la presencia ocasional de axones aislados que no forman un campo terminal definido. En la tabla superior se recogen las áreas visuales primaria y asociativas, mientras que en la inferior aparecen el resto de áreas corticales. Los casos en color se corresponden con los descritos en la Figura 81. Ver lista de abreviaturas.

Caso	Str	V1	LM	AL	LI	RL	A	AM	MM	PM	P	POR	V2L _{oc}	V2MM _{oc}
AAV26HD														
AAV34HI			*										*	
AAV35HI														
R273HD						*					*			
R275HD											*			
R248HD				*										
R236HD						*						*		
R286HD				*									*	

Caso	TeA	Ect	Ent	PRh	RSD	RSG	MptA	LptA	PPtR	M1	M2	Cg1	Cg2	FrA	PrL	AIV	MO	VO	AuD	S1	S2
AAV26HD																					
AAV34HI		*																	*		
AAV35HI	*																				
R273HD		*																			
R275HD									*												
R248HD																					
R236HD																					
R286HD	*					*	*														

Densidad alta
 Densidad media
 Densidad baja

3.3 Análisis de la distribución subcortical y cortical de las neuronas de proyección del LPMC

A continuación, estudiamos el sistema de proyección TC del núcleo LPMC a través de los 4 microdepósitos de trazadores anterógrados considerados (Figura 84). Éste es el núcleo del complejo LP de menor tamaño, localizado en el polo caudal de este complejo justo debajo del tracto óptico. Por ello este número de depósitos es suficiente para detectar el patrón de distribución de terminales axónicos en corteza que sigue este núcleo, como se puede observar en el anexo 3 que recoge la distribución tangencial y radial de capa uno de estos depósitos.

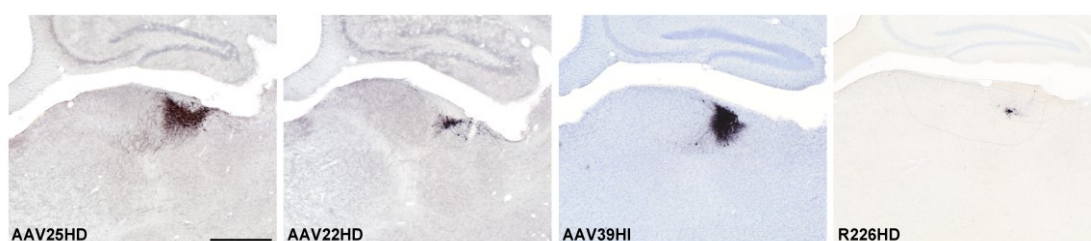


Figura 84. Resumen de los depósitos de trazadores anterógrados, BDA y AAV-GFP, en LPMC recogidos en este trabajo mostrados en secciones sagitales de ratón. En los que se indica la localización y extensión del centro de la inyección dentro del núcleo LPMC. Los mapas planos del marcado cortical correspondiente a la totalidad de estas inyecciones se recogen en el anexo 3. Barra de calibración de 500μm.

Se han seleccionado las dos inyecciones de los trazadores BDA y vector AAV-GFP, respectivamente, localizadas en los extremos medial (R226HD) y lateral (AAV22HD) del núcleo LPMC. Así, en la Figura 85 se muestra un mapa plano que incluye el patrón areal de ambos depósitos, sin hacer referencia a las capas corticales. En los dos casos, las dianas corticales que presentan mayor densidad de terminales axónicos, solapados de ambas inyecciones, son las localizadas en el polo temporal (TeA, Ect, PRh), así como las cortezas visuales asociativas que se consideran como salida de la corriente ventral de procesamiento de la información visual (LI, P, POR) (Wang y Burkhalter 2013; Baldwin et al. 2017). Esta distribución tangencial característica es compartida por todas los casos analizados del LPMC (Tabla 14). También observamos en todos los casos analizados una fuerte arborización terminal en V2Loc, y en el área LM que se ha considerado como la corteza visual de salida desde V1, común para la corriente dorsal y ventral de procesamiento visual (Kalatsky y Stryker 2003; Wang y Burkhalter 2007). El área V1 también va a recibir terminales desde LPMC, especialmente de las regiones laterales limítrofes con el núcleo dLGN, pero con un patrón de terminación radial distinto a este núcleo que veremos a continuación. Así como de forma ocasional aparecen terminales en otras áreas visuales asociativas como AL, RL, o AM. Por último, es necesario señalar que el depósito más lateral de

LPMC (R226HD) que se encuentra limitando con el núcleo LPMR, es el único caso en el que vemos escasos terminales axónicos en áreas corticales del polo frontal (FrA, M2) que pueden ser debido a que en la micropoblación marcada se encuentren neuronas pertenecientes al LPMR, debido al reducido tamaño de estos núcleos.

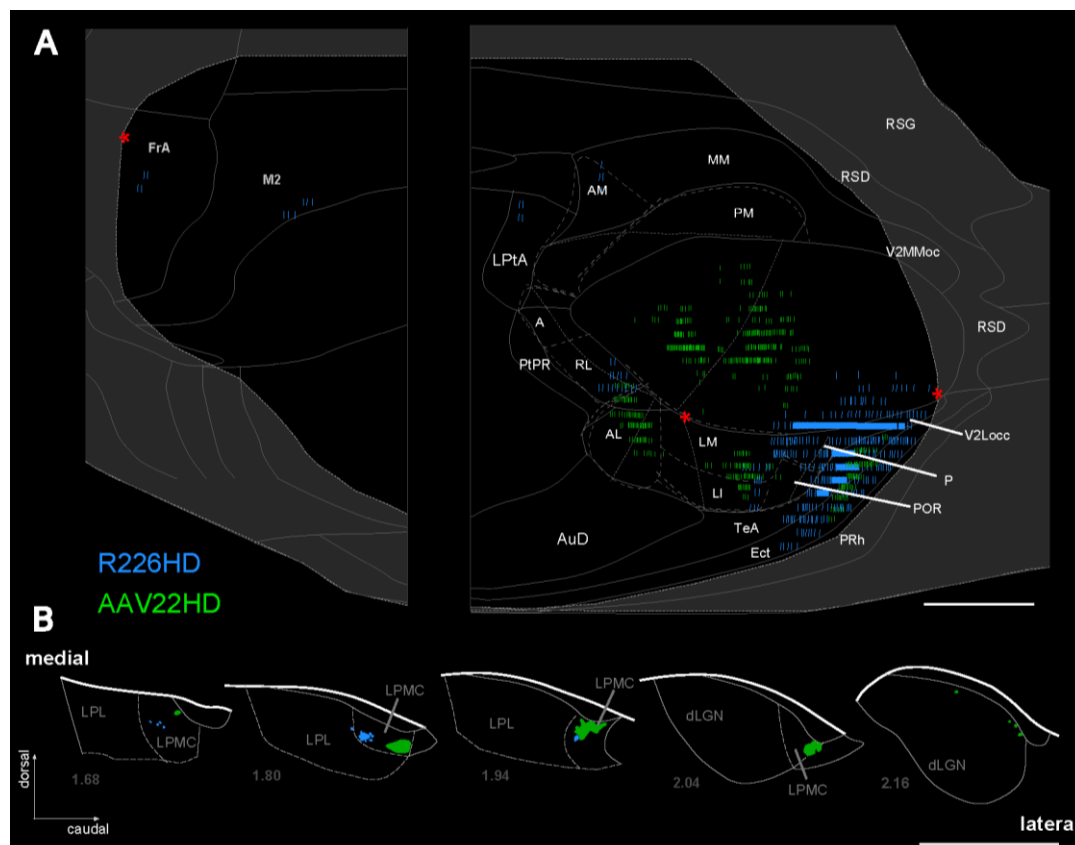


Figura 85. Distribución de los árboles axónicos corticales de dos depósitos representativos de BDA y AAV-GFP localizados mayoritariamente en LPMC en regiones laterales (verde) o mediales (azul) del mismo. (A) Mapa plano de la superficie cortical donde aparecen los terminales axónicos, representados en distinta intensidad en función de su densidad, de los depósitos analizados con color correspondiente al número del caso indicado en la parte superior. (B) Representación de los depósitos dentro del complejo LP sobre los esquemas talámicos sagitales en una progresión medio-lateral. Barras de calibración de 1mm (A, B). Ver lista de abreviaturas.

Para el análisis de la distribución laminar de terminales de las principales áreas diana de las proyecciones TC del núcleo LPMC, se muestra una serie de representaciones bajo cámara clara de las arborizaciones terminales de los axones, ya que no son apreciables por el bajo calibre de los axones, en microfotografías a pocos aumentos (Figura 86). Así en las áreas visuales extraestriadas como V2Loc, sus terminales axónicos se distribuyen principalmente entre las capas 1 e intermedias aunque en algunos puede variar su distribución a las capas 1 y 5, y en menor medida las capas intermedias (caso AAV39HI, Anexo 3). El patrón que sigue en áreas del polo temporal asociativas multimodales como TeA, Ect o PRh es principalmente a capas 1 e intermedias (3-4). Por último las áreas frontales (FrA, M2) inervadas de forma muy escasa en uno de los casos (R226HD) sólo presentan marcado en capa 1.

El patrón laminar en el área V1 no se ha representado por la variabilidad que presenta. Los casos más laterales del núcleo (AAV22HD, AAV25HD) en los que aparece una pequeña contaminación en el dLGN, observamos un fuerte marcado en la capa 3-4 de V1 que con alta probabilidad se corresponde con el patrón focal de inervación del núcleo dLGN en V1. Mientras que en los dos casos que no contaminan el dLGN (AAV39HI, R226HD), el patrón de terminales axónicas marcadas abarca únicamente las capas corticales 5 y 1 de V1 (ver anexo 3).

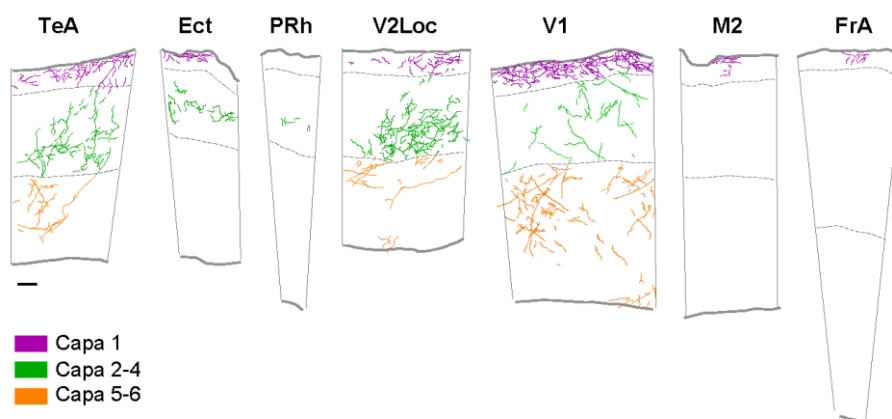


Figura 86. Representación esquemática del patrón laminar general en las áreas de máxima proyección de los depósitos de trazador anterógrado en el núcleo LPMC. Se observa la distribución de los terminales axónicos TC radialmente sobre dibujos bajo cámara clara de secciones sagitales siguiendo un código de color para las distintas láminas corticales como indica la leyenda. Observa del detalle del distinto grosor de cada una de estas áreas corticales. Barra de calibración de 50µm. Ver lista de abreviaturas.

Las proyecciones TC originadas en el LPMC son con gran diferencia las que van a tener un mayor componente subcortical de inervación. En la totalidad de los casos considerados en este trabajo se ha observado la presencia de axones varicosos en distinta densidad tanto en el estriado como en el núcleo lateral de la amígdala (LA, Tabla 14). En la Figura 87, se ha representado dibujos bajo cámara clara de los terminales marcados en estas dos estructuras en los casos R226HD (verde), AAV22HD (azul), AAV39HI (naranja) y AAV25HI (rojo, Anexo 3). Hay que señalar que en estos esquemas sagitales hemos dibujado el conjunto de todos los axones observados sin distinguir si presentaban varicosidades. En un análisis en mayor detalle observamos que los campos de terminales axónicos varicosos aparecen en la región más lateral del Str y en la parte dorsal del LA, apareciendo tan sólo fibras de paso no varicosas por el núcleo basolateral de la amígdala (BLA).

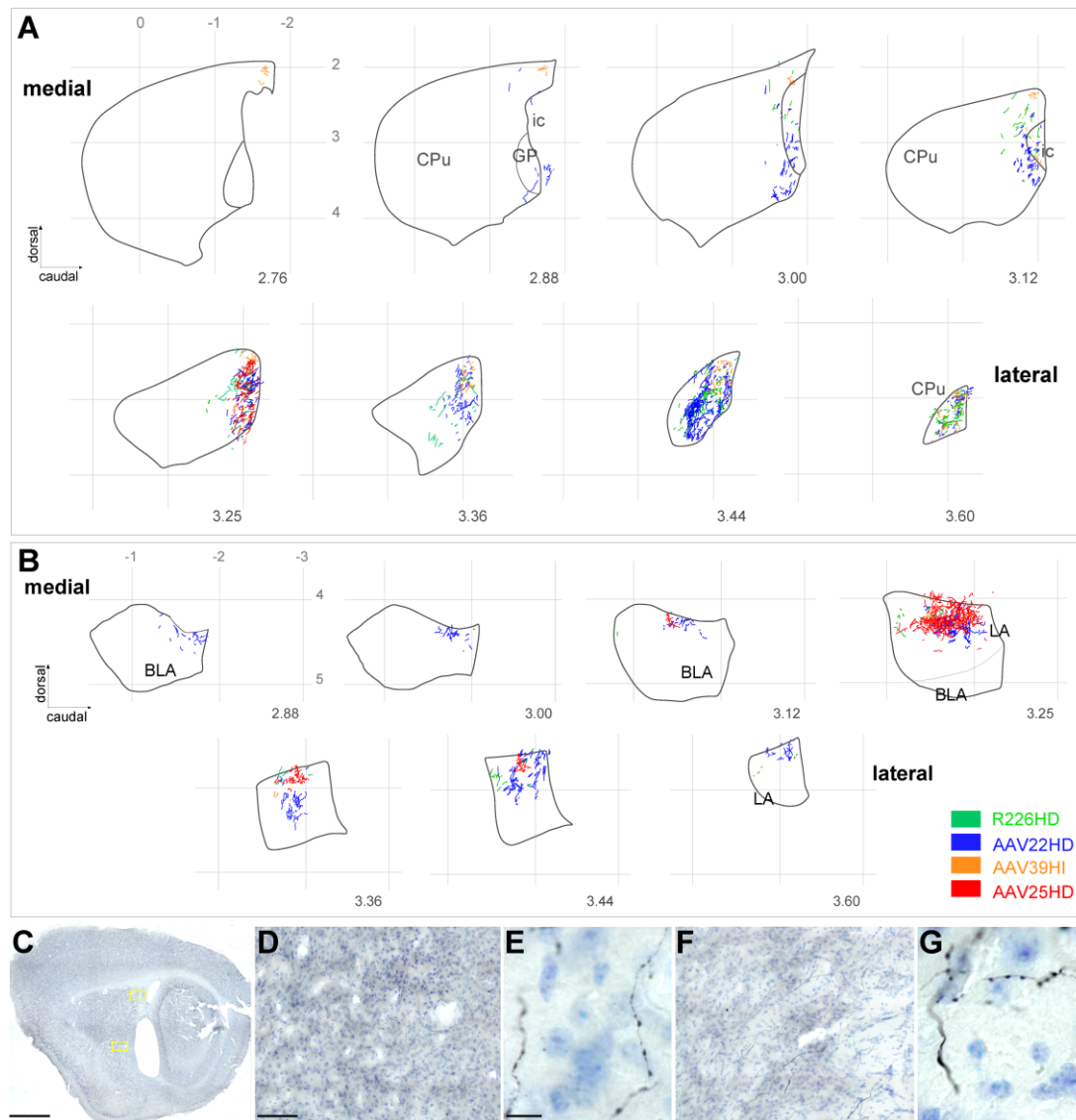


Figura 87. Distribución de la innervación estriatal y amigdalina en cuatro depósitos localizados en LPMC. (A) Representación en secciones sagitales modelo del estriado de ratón de los terminales varicosos procedentes de los cuatro casos en el núcleo LPMC, cuya ubicación se indica en la Figura 84. (B) Esquemas de las secciones sagitales de la amígdala lateral y basolateral donde se ha dibujado bajo cámara clara la innervación amigdalina del LPMC. Cada sección modelo en las figuras A y B procede del atlas Paxinos y Franklin (2008) donde se ha indicado referencias en los tres ejes del espacio para facilitar la visualización de su posición y escala. (C) Microfotografía de una sección sagital donde hemos observado marcado en ambas regiones. (D-G) Detalles a distintos aumentos de las varicosidades axónicas localizadas en Str (D,E) y LA (F,G) señaladas sobre la fotografía C con un recuadro amarillo. Barras de calibración de 1000µm (C), 100µm (D,F) y 10µm (E,G). Ver lista de abreviaturas.

Tabla 14. Resumen mostrando la densidad de marcado axónico terminal de forma cualitativa en la corteza cerebral. En la tabla se muestra en una escala de intensidad de grises que se corresponde directamente con la densidad de campos terminales observada en cada área cortical concreta. Los asteriscos negros indican la presencia ocasional de axones aislados que no forman un campo terminal definido. En la tabla superior se recogen las áreas visuales primaria y asociativas, mientras que en la inferior aparecen el resto de áreas corticales. Los casos en color son los descritos en la Figura 84. Ver lista de abreviaturas.

Caso	Str	LA	V1	LM	AL	LI	RL	A	AM	MM	PM	P	POR	V2L _{oc}	V2MM _{oc}
AAV22HD							*				*				
AAV25HD							*		*						
R226HD							*		*						
AAV39HI					*										

Caso	TeA	Ect	Ent	PRh	RSD	RSG	MptA	LptA	PptR	M1	M2	Cg1	Cg2	FrA	PrL	AIV	MO	VO	AuD	S1	S2
AAV22HD																					
AAV25HD																			*		*
AAV39HI				*																	
R226HD								*						*							

Densidad alta
 Densidad media
 Densidad baja

3.4 Análisis de la distribución subcortical y cortical de las neuronas de proyección del LPMR

El último de los núcleos estudiados que también conforma el complejo LP de roedores es el LPMR. Este núcleo es el de mayor extensión dentro del complejo LP por lo que se han considerados un total de 13 depósitos de trazadores anterógrados, en su mayoría realizados utilizando el vector viral AAV-GFP. La Figura 88 contiene la colección completa de secciones sagitales talámicas mostrando los centros de los depósitos analizados, cuyo patrón de proyección cortical, tangencial y laminar, específico para cada caso se refleja en el anexo 3.

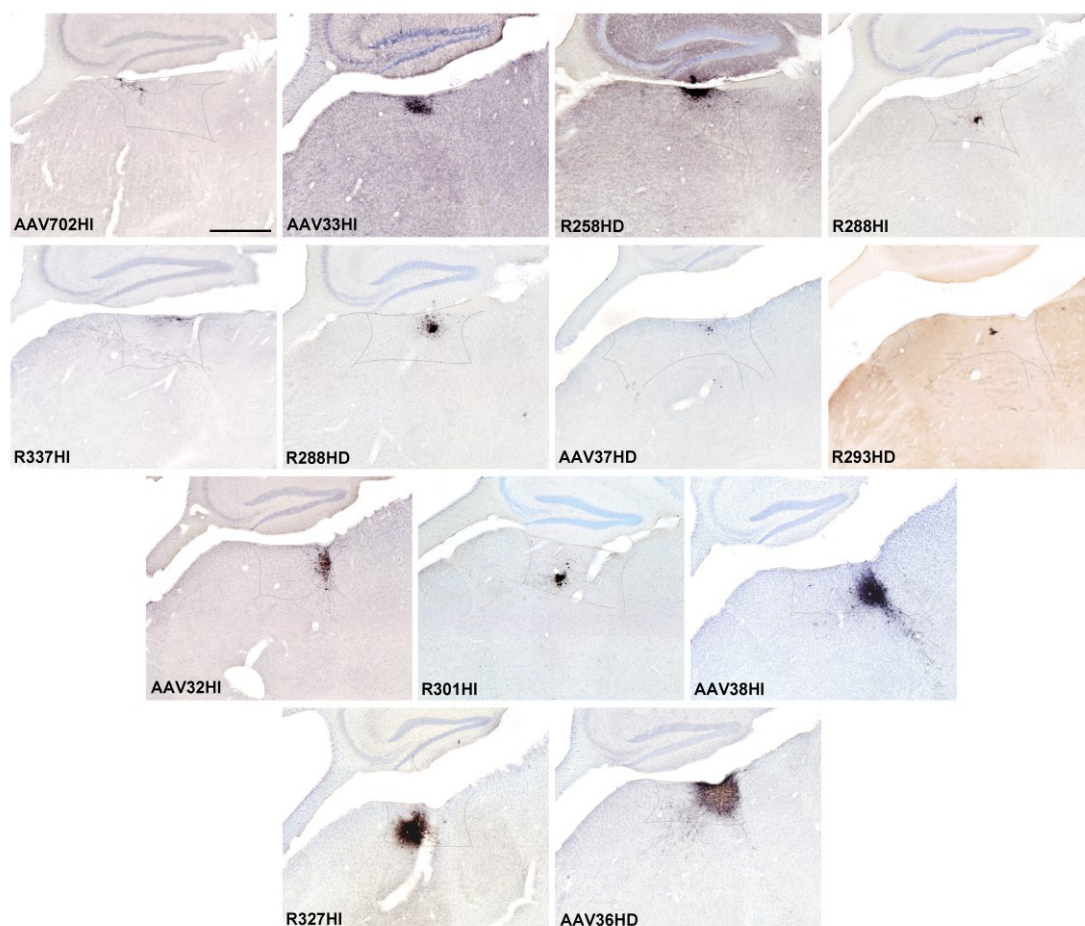


Figura 88. Resumen de los depósitos de los dos trazadores anterógrados utilizados en LPMR analizados en este trabajo mostrados en secciones sagitales de ratón. En los que se indica la localización del centro de la inyección dentro del núcleo LPMR. Los mapas planos del marcado cortical correspondiente a la totalidad de estas inyecciones se recogen en el anexo 4. Barra de calibración de 500µm.

En vista a los resultados, queda claro que se trata de un núcleo que presenta un sistema de proyección TC de alta complejidad y diversidad. Por esto, con el fin de detectar algún tipo de distribución topográfica determinada en su interior, seleccionamos cinco microdepósitos en función de su localización en el dentro del LPMR (Figura 89). En primer lugar escogimos un depósito restringido a la porción lateral del núcleo evitando contaminar el núcleo LPL (R288HD). A continuación, dos depósitos situados en la porción central del núcleo pero separados en el eje anteroposterior, uno de ellos localizado rostralmente (R301HI) y el otro caudalmente (AAV32HI). Por último, escogimos de nuevo dos depósitos localizados rostral- (R327HI) y caudalmente (AAV36HD) de mayor tamaño, pero cuyo centro del depósito se encontrara en la porción medial del núcleo LPMR (Figura 89).

Así, el primer rasgo aparente que observamos es que a medida que las microinyecciones engloban regiones más mediales del LPMR, aumenta considerablemente la extensión y el número de áreas inervadas por la micropoblación neuronal marcada. El caso R288HD muestra

un patrón de distribución tangencial de terminales axónicos corticales semejante al descrito para el núcleo LPL, restringido a cortezas visuales primaria y asociativas, aunque además incluye proyecciones a cortezas situadas en el polo temporal, lo que es un rasgo muy característico de la innervación cortical del núcleo LPMC.

Por otro lado, los dos casos situados en la porción central del núcleo LPMR presentan una mayor extensión areal alcanzando múltiples áreas corticales fuera de la corteza visual, tanto temporales (TeA, Ect, PRh, región caudal de la corteza auditiva), como parietales (LPtA, MPtA), retrospleniales (RSD/RSG), cingulares anteriores (PrL) y posteriores (Cg1, Cg2), motoras (M2), orbitarias (VO, MO) e insular (AIV).

Cuando el depósito de trazador anterógrado alcanza la pared medial del núcleo LPMR (casos AAV36DH y R327HI), limitando con los núcleos talámicos dorsomedial (MD) y central-lateral (CL), observamos en el mapa plano inferior (Figura 89) que se mantiene la distribución tangencial a las áreas corticales descritas para los dos casos anteriores. Además, aparece marcado axónico en algunas áreas nuevas en el polo frontal (FrA) y ocasionalmente en la superficie ventral del polo occipital (regiones de la corteza entorrinal). Se observa en general un claro aumento en la densidad de los árboles terminales en corteza, que puede ser debido al mayor tamaño de estos dos últimos depósitos.

Cuando analizamos la densidad de terminales axónicos marcados en cada una de estas áreas corticales para los 13 depósitos limitados a LPMR que hemos analizado y aparecen recogidos en la Tabla 15. Observamos que este el número de áreas corticales a las que proyectan los depósitos mediales en LPMR son constantes, y muy superiores en número a las áreas de proyección de la región lateral del núcleo. Esto nos permite intuir una cierta subdivisión de poblaciones neuronales dentro de este núcleo en base a su hodología. Por el contrario, cuando observamos distintos depósitos localizados en distintas posiciones del eje anteroposterior, no se observan cambios notables diferenciales de la distribución de terminales axónicos, ya que acaban alcanzando prácticamente la totalidad de las cortezas visuales asociativas en todos los casos sin mostrar una preferencia marcada (Tabla 15).

Figura 89. Representación de la distribución tangencial de las proyecciones TC de 5 depósitos representativos de trazadores anterógrados cuya extensión se adscribe principalmente al núcleo LPMR. (A) Los cinco depósitos seleccionados se han representados en un total de tres mapas planos de la superficie cortical. En el mapa superior se sitúan los depósitos de trazador situados en el extremo lateral del núcleo, en el mapa central aparece el marcado axónico de dos depósitos localizados en el centro del núcleo, y en el mapa inferior se representa el marcado cortical de dos depósitos localizados en el extremo medial del núcleo LPMR. El color de estos depósitos analizados se corresponde con el color del número del caso indicado. Se han incluido los nombres de las áreas corticales donde se han observado terminales. (B) Representación de los depósitos dentro del complejo LP sobre los esquemas talámicos sagitales en una progresión medio-lateral. Barras de calibración de 1mm (A, B). Ver lista de abreviaturas.

El patrón de distribución laminar que encontramos en las múltiples áreas corticales inervadas por el LPMR es muy variado, como recoge el anexo 3 (Figura 90). Mientras que en corteza visual primaria termina marcadamente en capas 1 y 5, el cinturón de cortezas visuales extraestriadas muestra un patrón laminar alterno alcanzando las láminas 1 e intermedias (3-4) o bien en otros casos capas 1 y profundas (5). Las cortezas del polo temporal (TeA, Ect, PRh) reciben proyecciones axónicas desde este núcleo en las láminas 1 e intermedias (3-4), este mismo patrón radial de terminación se observa en cortezas retrospleniales (RSD). Por el contrario, las cortezas parietales (LPtA, MPtA) poseen una distribución de terminales variable similar al caso de las cortezas visuales asociativas, alcanzando la capa 1 e intermedias (3-4), y en algunos casos la capa 1 y capas profundas (5).

En cuanto al resto de áreas corticales extendidas a lo largo de toda la superficie cerebral que alcanzan los axones del LPMR de múltiples modalidades sensoriales, motoras, límbicas y asociativas que hemos descrito anteriormente; el patrón laminar hallado es, en la mayoría de los casos, limitado a la capa cortical 1.

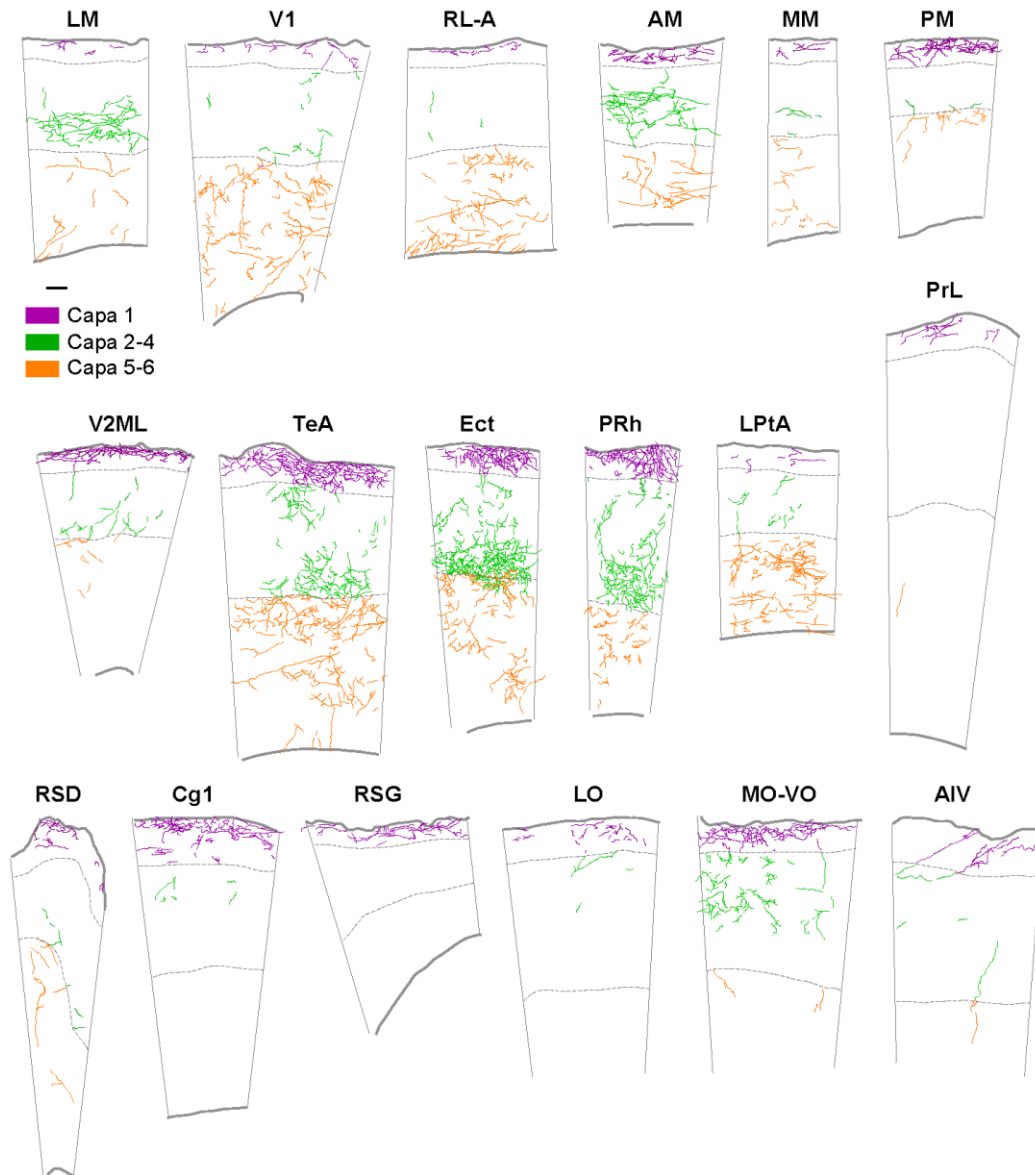


Figura 90. Distribución de los terminales axónicos TC radialmente en las distintas láminas corticales, como queda indicado en la leyenda, procedentes de los depósitos anterógrados localizados en el núcleo LPMR. Se han escogido las principales áreas occipitales, temporales, parietales y frontales para representar la distribución laminar mayoritaria en las mismas. Se indica las variaciones en el grosor cortical entre las distintas áreas considerando siempre que los dibujos proceden de secciones sagitales. Barra de calibración de 50µm. Ver lista de abreviaturas.

Entre las proyecciones subcorticales de las neuronas del LPMR se cuentan tanto el estriado como la amígdala, aunque en menor frecuencia y densidad que el LPMC (Figura 91). En el 75% de los casos considerados en este estudio (Tabla 15) observamos marcado en el Str, específicamente a lo largo de la región dorsocaudal y, en ocasiones, central. Mientras que en un 30% de los casos, vemos campos de terminales axónicos varicosos en LA. Se han escogido como modelo para la representación de sus proyecciones estriatales y amigdalinas los casos R288HD (verde), R288HI (azul), AAV38HI (naranja) y AAV37HD (rojo). En la Figura 91B, en las ocasiones

en que aparecen dibujados terminales en BLA, como hemos comentado para el LPMC, se trata de fibras axónicas de paso no varicosas.

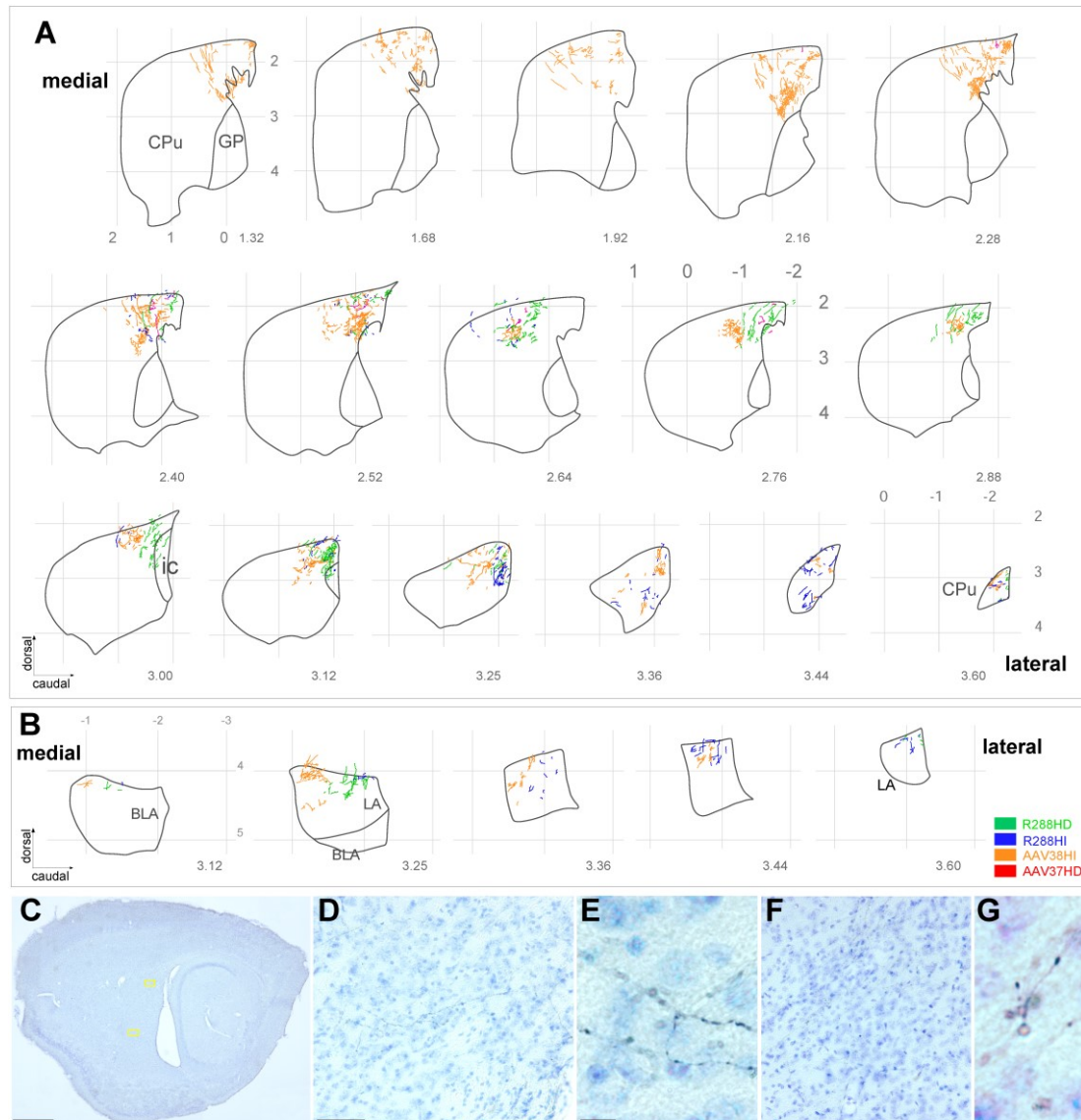


Figura 91. Distribución de la innervación estriatal y amigdalina en cuatro depósitos de trazadores anterógrafos localizados en LPMR. (A) Representación en secciones sagitales modelo del estriado de ratón de los terminales observados bajo cámara clara en toda su extensión medio-lateral procedentes de neuronas del núcleo LPL. La ubicación de los cuatro depósitos correspondientes se indica en la Figura 88. (B) Esquemas de las secciones sagitales de la amígdala lateral y basolateral donde se ha dibujado bajo cámara clara la innervación amigdalina del LPMC. Cada sección modelo en las figuras A y B procede del atlas Paxinos y Franklin (2008) como referencia de posición y escala. (C) Microfotografía de una sección sagital donde hemos observado marcado en ambas regiones. (D-G) Detalles a distintos aumentos de las varicosidades axónicas localizadas en Str (D,E) y LA (F,G) señaladas sobre la fotografía C con un recuadro amarillo. Barras de calibración de 1000µm (C), 100µm (D,F) y 10µm (E,G). Ver lista de abreviaturas.

Tabla 15. Resumen de la distribución cortical de terminales axónicos marcados tras depósitos de trazadores anterógrados en el núcleo LPMR. En la tabla se muestra en una escala de intensidad de grises que se corresponde directamente con la densidad de campos terminales observada en cada área cortical concreta. Los asteriscos negros indican la presencia ocasional de axones aislados que no forman un campo terminal definido. En la tabla superior se recogen las áreas visuales primaria y asociativas, mientras que en la inferior aparecen el resto de áreas corticales. El color de los casos seleccionados se corresponde con los descritos en la Figura 87. Ver lista de abreviaturas

Caso	Str	LA	V1	LM	AL	LI	RL	A	AM	MM	PM	P	POR	V2L _{oc}	V2MM _{oc}
R327HI	*		*				*								
AAV36HD															
AAV37HD			*					*			*		*	*	*
AAV38HI															
AAV32HI					*		*								
AAV33HI	*									*	*				
R337HI		*				*			*						
AAV702HI	*				*				*						
R288HI															*
R288HD		*			*						*			*	
R258HD															
R301HI							*						*	*	
R293HD													*	*	

Caso	TeA	Ect	Ent	PRh	RSD	RSG	MPTA	LPTA	PPtR	M1	M2	Cg1	Cg2	FrA	PrL	AIV	MO	LO	VO	AuD	S1	S2
R327HI						*			*		*	*									*	
AAV36HD			*						*		*	*								*		
AAV37HD						*				*				*	*		*	*	*		*	
AAV38HI			*	*										*	*		*	*	*		*	*
AAV32HI			*			*								*	*	*	*	*	*		*	*
AAV33HI						*		*			*	*		*	*		*	*	*	*		
R337HI																						
AAV702HI									*												*	
R288HI						*					*			*							*	
R288HD					*																	
R258HD																						
R301HI								*	*						*		*		*			
R293HD						*									*							

Densidad alta
 Densidad media
 Densidad baja

3.5 Análisis de tamaño de las varicosidades axónicas de los distintos núcleos del tálamo visual

Tras un detallado análisis de las proyecciones TC originadas en los cuatro núcleos objeto de nuestro estudio, se observaron claras diferencias bajo microscopía óptica en los engrosamientos axónicos de las arborizaciones terminales en corteza, gracias a la calidad de marcado axónico proporcionada por los trazadores anterógrados seleccionados. Es por esto que se profundizó en el estudio de las varicosidades axónicas en las principales áreas corticales de máxima inervación por las neuronas localizadas en el dLGN, LPL, LPMC y LPMR. Estos engrosamientos son considerados elementos putativos de los contactos sinápticos, por lo que poseen una connotación funcional del papel de estos terminales en las distintas áreas y capas corticales que están innervando.

En base a estudios previos en relación al sistema somatosensorial (Viaene et al. 2011a, 2011c; Marion et al. 2013), decidimos establecer comparaciones del tamaño relativo de las varicosidades axónicas corticales localizadas en áreas visuales primaria y asociativa del núcleo driver por excelencia que estudiamos, el dLGN, y el núcleo que en base a su característico sistema de proyección TC, podemos considerar en máximo grado modulador, el LPMR. Es por ello que escogimos para el muestreo, regiones aleatorias de las láminas corticales de máxima proyección en las áreas V1 y LM de estos dos núcleos, para determinar la existencia real de estas aparentes diferencias en tamaño.

Comenzamos analizando las áreas corticales inervadas por el dLGN: V1 en capas intermedias (3-4, color azul en la Figura 92) y el área LM en capas superficiales (1, color rojo en la Figura 92). Para ello se tomaron 3 casos de depósitos de BDA en dLGN que mostraban un marcado axónico óptimo, y se midió el área del plano de máxima proyección de 300 varicosidades en las capas 3-4 de V1 y capa 1 de LM. Se seleccionaron los depósitos realizados con el trazador BDA, ya que en nuestro laboratorio se ha medido el área de máxima proyección de las varicosidades de los axones TC procedentes de inyecciones de este trazador en otros núcleos del tálamo de ratón, que podemos utilizar como control para nuestras medidas. El tamaño medio de las varicosidades axónicas, siempre seguidas de su error estándar de la media (SEM) de los tres casos, del dLGN en capas intermedias de V1 es de $1,35 \pm 0,03 \mu\text{m}^2$; mientras que en capa 1 de LM son de $0,62 \pm 0,02 \mu\text{m}^2$. Para el análisis estadístico no consideramos valores absolutos sino frecuencia de aparición de áreas de proyección máxima pertenecientes a un determinado intervalo de tamaño con el fin de relativizar los valores, como se representa en la gráfica de la Figura 92A que incluye los polígonos de frecuencia de distribución del tamaño de las varicosidades media de los tres casos cuantificados para cada área y lámina cortical analizada.

Por otro lado, continuamos midiendo el área de proyección máxima de los engrosamientos axónicos corticales procedentes de poblaciones neuronales del LPMR marcadas con BDA. Como hemos comentado escogimos varios marcos de muestreo de forma aleatoria en la capa 5 de V1 (color verde en la Figura 92) y las láminas corticales 3-4 del área LM (color morado en la Figura 92). Los resultados de tamaño relativo medio de estas varicosidades muestran que es de $0,71 \pm 0,02 \mu\text{m}^2$ para la capa 5 de V1 y de $1,18 \pm 0,03 \mu\text{m}^2$ en el caso de las capas intermedias de LM.

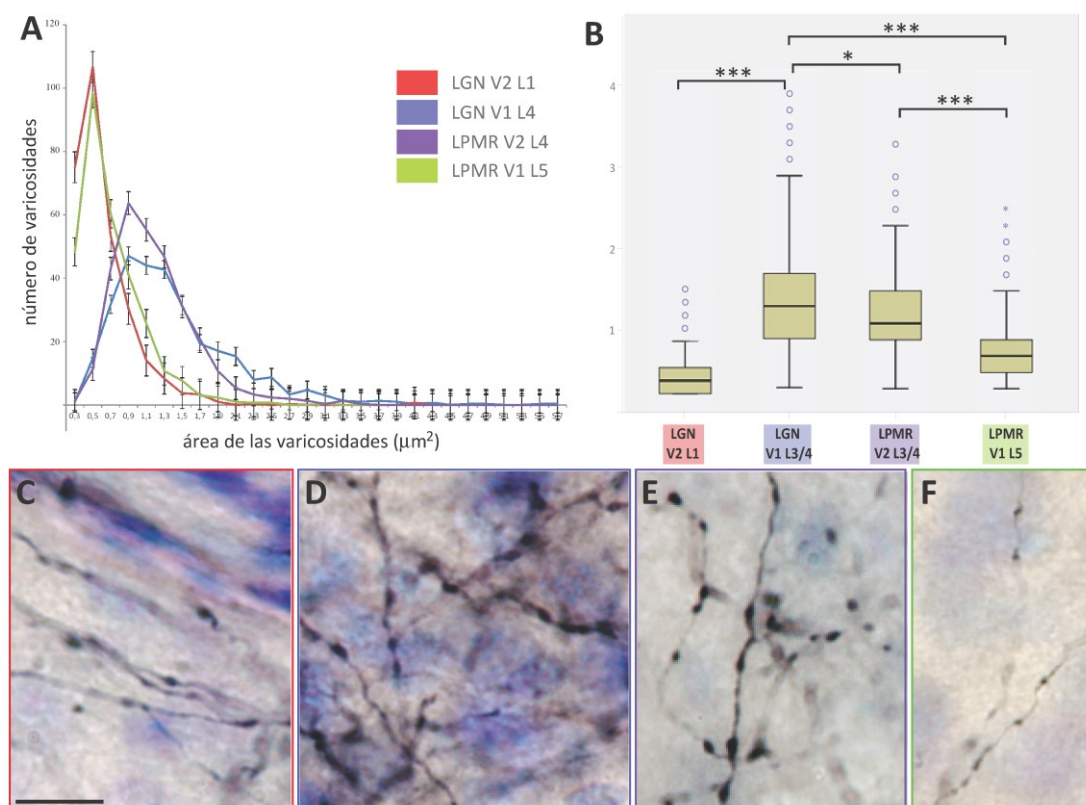


Figura 92. Comparación del tamaño de las varicosidades axónicas procedentes de los núcleos dLGN y LPMR. (A) Curvas de frecuencias del tamaño de las varicosidades de neuronas del dLGN en las capas 1 (rojo) de V2 e intermedias (azul) de V1, y de neuronas del LPMR en capa 4 de V2 (morado) y capa 5 de V1 (verde), en las que se muestra la media de los 3 casos (\pm SD, desviación estándar). (B) Diagrama de cajas y bigotes que muestra la dispersión de los datos para cada área y lámina cortical analizada, incluyendo en forma el valor de su mediana, máximo y mínimo, rango intercuartil, y valores aislados (señalados en círculos). También de indican mediante barras horizontales las comparaciones de medianas establecidas para los test estadísticos y con un asterisco el grado de significación obtenido en el test de Mann-Whitney (* entre 0,05-0,01; ** 0,01; *** en caso de ser 0). (C, D, E, F) Microfotografías de los terminales axónicos corticales marcados con BDA observados mediante microscopía óptica para la medida del área de máxima proyección de las varicosidades que presentan, siguiendo el código de colores para las áreas y capas que muestra el gráfico. Barra de calibración de 10 μ m (C, D, E, F). Ver lista de abreviaturas.

Con estos datos intervalos de frecuencia se aplicó el test estadístico Shapiro-Wilk para contrastar la normalidad de la distribución de las muestras, obteniendo un resultado significativo en todos los casos, lo que nos permite afirmar que las poblaciones de medidas del tamaño no presentan una distribución normal. Al incumplir uno de los tres requisistos para el uso de test estadísticos paramétricos, usamos el test Kolmogorov-Smirnov (estadístico Z) para determinar la bondad de ajuste o discrepancias entre los valores observados y esperados al comparar estadísticamente las medias de las distribuciones por parejas. Y el test U de Mann-Whitney (estadístico U) para la comparación las medianas también por pares de distribuciones independientes. Las parejas seleccionadas para estas comparaciones, como se indica en el diagrama de cajas y bigotes de la Figura 92B, fueron en primer lugar, la distribución de intervalos de tamaños de varicosidades en dLGN entre capa 3-4 de V1 y capa 1 de V2, obteniendo los

valores $Z=7,56$ ($p\text{-valor}=0,00$) y $U=9687$ ($p\text{-valor}=0,00$) que en ambos casos nos dice que las distribuciones son significativamente diferentes. Después comparamos dentro de LPMR las distribuciones de áreas de varicosidades entre capa 5 de V1 y capa 3-4 de V2, obteniendo $Z=6,13$ ($p\text{-valor}=0,00$) y $U=16326$ ($p\text{-valor}=0,00$), corroborando las diferencias entre el tamaño relativo de varicosidades entre estas áreas. Por último, establecimos comparaciones entre estos núcleos *driver* (dLGN) y *modulator* (LPMR) entre sus áreas y láminas de máxima inervación: entre capa 3-4 de V1 del dLGN y capa 3-4 de V2 de LPMR obteniendo $Z=1,33$ ($p\text{-valor}=0,05$) y $U=37188$ ($p\text{-valor}=0,05$) que afirma la existencia de diferencias entre los tamaños relativos con una menor significación, y entre capa 3-4 de V1 de dLGN y capa 5 de V1 de LPMR resultando en $Z=6,30$ ($p\text{-valor}=0,00$) y $U=14033$ ($p\text{-valor}=0,00$), entre los que también se puede asegurar las diferencias de tamaños relativos.

4 ESTUDIO CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE NEURONAS AISLADAS EN EL TÁLAMO VISUAL

Como se ha comentado en el capítulo de la introducción, la reconstrucción completa de la morfología y conectividad axónica de neuronas aisladas nos permite conocer en detalle la trayectoria de los axones TC desde que abandonan el tálamo. Podemos asegurar la presencia tanto de colaterales axónicas para inervar estructuras subcorticales, como la división a lo largo de su paso por la sustancia blanca cortical en uno o múltiples ramas colaterales que pueden inervar de forma simultánea múltiples áreas corticales. Esta pregunta es incluso más interesante en relación a núcleos talámicos como el LPMR, cuyas micropoblaciones neuronales presentan un sistema de proyección subcortical y cortical tan extenso inervando una gran cantidad de áreas corticales muy alejadas entre sí. Este hecho, como se ha comentado, podría tener gran repercusión en procesos atencionales o en respuestas motoras inconscientes (Day-Brown et al. 2010b). Mediante el uso del método de electroporación neuronal *in vivo* del material genético de los vectores virales Sindbis-GFP y AAV-GFP, obtuvimos un total de 10 neuronas aisladas en diversos núcleos del tálamo visual. En este trabajo, de momento incluimos las neuronas aisladas que tenemos reconstruidas en su totalidad en 3D: 2 neuronas del dLGN y 2 neuronas del núcleo LPL.

4.1 Arquitectura de las neuronas del dLGN

A diferencia de las neuronas pertenecientes al complejo LP, no aparecen reconstrucciones bi- o tridimensionales completas del dominio somato-dendrítico junto con la arborización terminal en su totalidad del núcleo dLGN en la literatura. Y, a pesar de tratarse de uno de los núcleos talámicos mejor estudiados en diversas especies, se desconoce la extensión en la inervación cortical del árbol axónico de una única neurona del dLGN, así como posibilidad de inerva. A continuación, en la Figura 93 se muestran dos neuronas contenidas en este núcleo, contenidas en una misma sección sagital, pero que a pesar de esto van a presentar dos proyecciones corticales alejadas entre sí como refleja el mapa plano de la superficie cortical. Estas arborizaciones terminales incluso van a inervan áreas corticales distintas mostrando una distribución laminar de terminales muy diferente. Mientras que la neurona situada dorsalmente en el dLGN (color naranja) muestra una arborización muy focalizada y especialmente densa en las capas 3-4 de V1, dejando de forma muy escasa terminales en capa 1. La neurona localizada ventralmente a la anterior en el mismo plano sagital manda sus axones fuera de V1, a un área visual asociativa (AL), donde muestra gran densidad de terminales en capas superficiales.

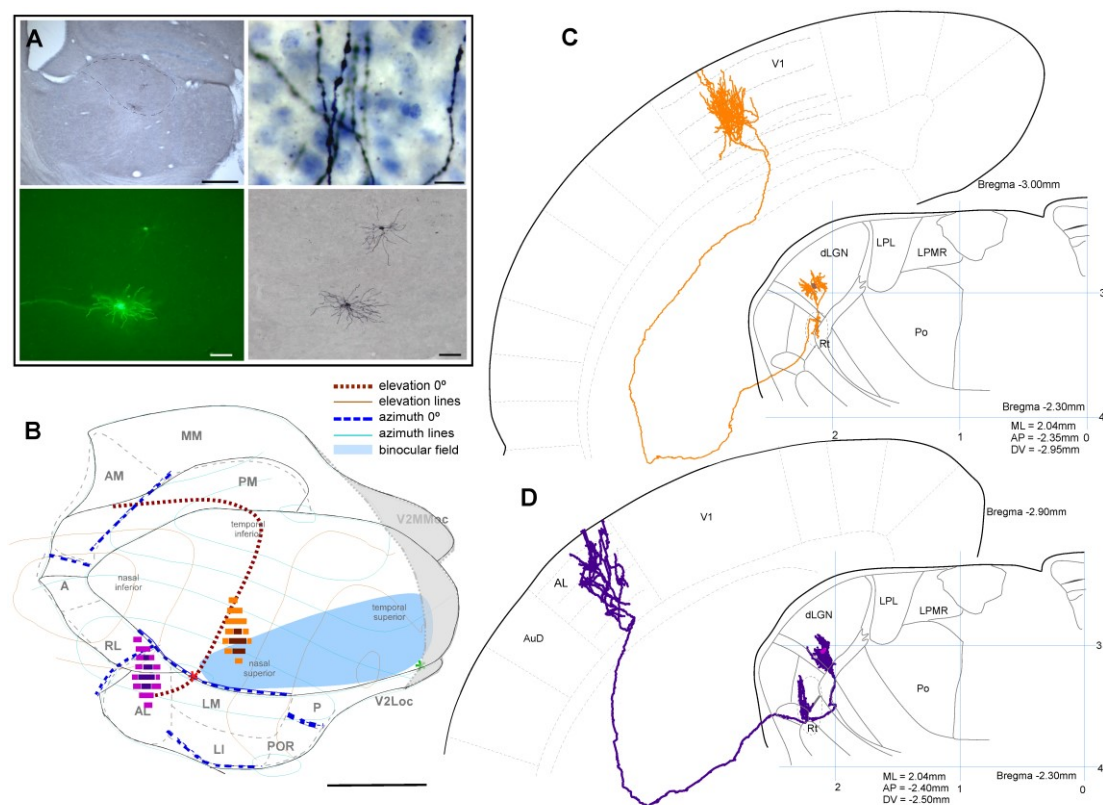


Figura 93. Distribución subcortical y cortical de los axones de dos neuronas aisladas transfectadas en un mismo experimento con el RNA del vector Sinbis-GFP en el núcleo dLGN. (A) Se muestran cuatro microfotografías que señalan la localización de ambas neuronas en una sección sagital del tálamo de ratón en fluorescencia y tras su revelado inmunohistoquímico. También se muestra un detalle de axones varicosos en un campo terminal en V1. (B) Mapa plano de la superficie cortical en el que se ha representado la localización de ambas arborizaciones axónicas corticales mediante dos intensidades de color que indican la máxima densidad de terminales axón en el centro. También se han incluido varios grados de elevación y azimuth, así como la extensión cortical del campo binocular como se indica en la leyenda. (C, D) Reconstrucción tridimensional mediante el software Neurolucida del dominio somatodendrítico, colaterales en el núcleo reticular talámico y la longitud completa del axón de cada una de las neuronas. Se indica la situación del soma y de la arborización terminal en secciones coronales talámicas, añadiendo sus coordenadas AP, ML y DV asociadas a la posición del soma. Barras de calibración de 500 μ m (A), 100 μ m (A), 10 μ m (A) y 1mm (B). Ver lista de abreviaturas.

4.2 Arquitectura de las neuronas del complejo LP

En la Figura 94 y 95, se muestran un total de cuatro neuronas localizadas en la región rostral (color verde oscuro), caudal (color azul), dorsolateral (color marrón) y en el borde ventral limitante con el Po (color verde) del núcleo LPL obtenidas en cuatro experimentos independientes. La neurona situada caudalmente en el núcleo muestra una proyección cortical que alcanza el borde entre las áreas AL y LM distribuyendo sus terminales axónicos densamente entre las capas superficiales (1) e intermedias (3-4).

Por el contrario, las proyecciones TC procedente de la neurona situada en la porción rostral del LPL van a proyectar a dos áreas corticales más alejadas entre sí mediante la emisión de una

colateral axónica en la sustancia blanca, como son V2Loc y el polo occipital de V1 presentando a diferencia de la neurona anterior un patrón laminar distinto en ambas áreas. La arborización terminal en V2Loc muestra mayor densidad de marcado axónico en las capas superficial (1) e intermedias (3-4). Sin embargo, a pesar de que en la corteza estriada se observan muchos axones de paso en capas profundas, el campo terminal donde se ramifican profusamente es en su mayoría en capa 1.

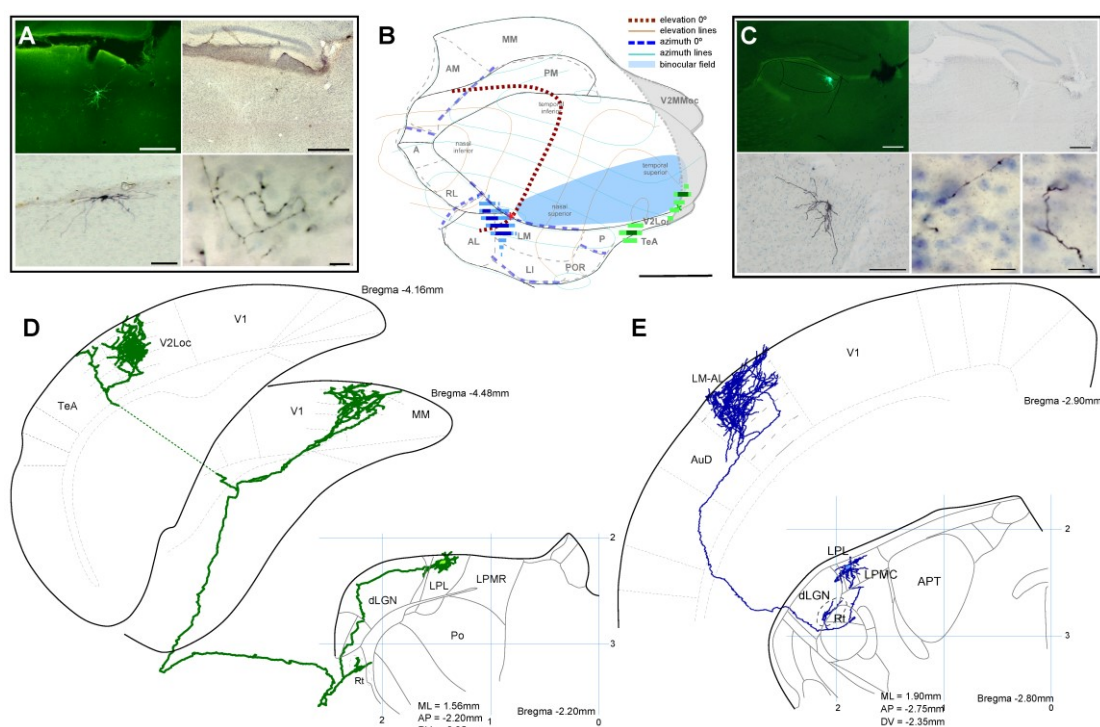


Figura 94. Distribución subcortical y cortical de los axones de dos neuronas aisladas transfectadas con el RNA del vector Sinbis-GFP (azul) y con el DNA plasmídico del vector AAV-GFP (verde oscuro) localizadas en distintas regiones del núcleo LPL. (A, C) Se muestran ocho microfotografías que señalan la localización de ambas neuronas en una sección sagital del tálamo de ratón en fluorescencia y tras su revelado inmunohistoquímico. También se muestra un detalle del soma y de los axones terminales varicosos en cortezas visuales asociativas, en los que se observa las diferencias entre ambos vectores en la localización del GFP (precipitado negro) en el citoplasma (AAV-GFP) o en la membrana celular (Sindbis-GFP). (B) Mapa plano de la superficie cortical en el que se ha representado la localización de ambas arborizaciones axónicas corticales mediante dos intensidades de color que indican la máxima densidad de terminales axón en el centro. También se han incluido varios grados de elevación y azimuth, así como la extensión cortical del campo binocular como se indica en la leyenda. (D, E) Reconstrucciones tridimensionales mediante el software Neurolucida del dominio somatodendrítico, colaterales en el núcleo reticular talámico y la longitud completa del axón de cada una de las neuronas por separado. Se indica la situación del soma y de la arborización terminal en secciones coronales talámicas, añadiendo sus coordenadas AP, ML y DV asociadas a la posición del soma. Barras de calibración de 250µm (A), 50µm (A), 10µm (A), 1mm (B), 200µm (C), 100µm (C) y 10µm (C). Ver lista de abreviaturas.

Las neuronas de la Figura 95 muestran mayor número de ramificaciones, especialmente la neurona 95C (verde) que incluso posee una proyección subcortical en el Str dorsal. Para ajustar los parches corticales a las secciones coronales modelo del atlas de Paxinos y Franklin (2008)

hemos añadido en algunos casos tramos de línea discontinua. La neurona 95C localizada caudalmente en el extremo ventral del LPL se va a ramificar en 4 puntos en la capa 6, a través de la viaja para inervar capas intermedias y superficiales de Ect, capa 5 de AL-RL, capa 5 y 1 de V1, y capas 1 y 3-4 de V2MMoc. Mientras que la neurona 95D (marrón) de igual forma a través de la capa 6, forma campos terminales en capas 1 y 3-4 de AL, capa 1 de V1 y capa 1 de V2MMoc.

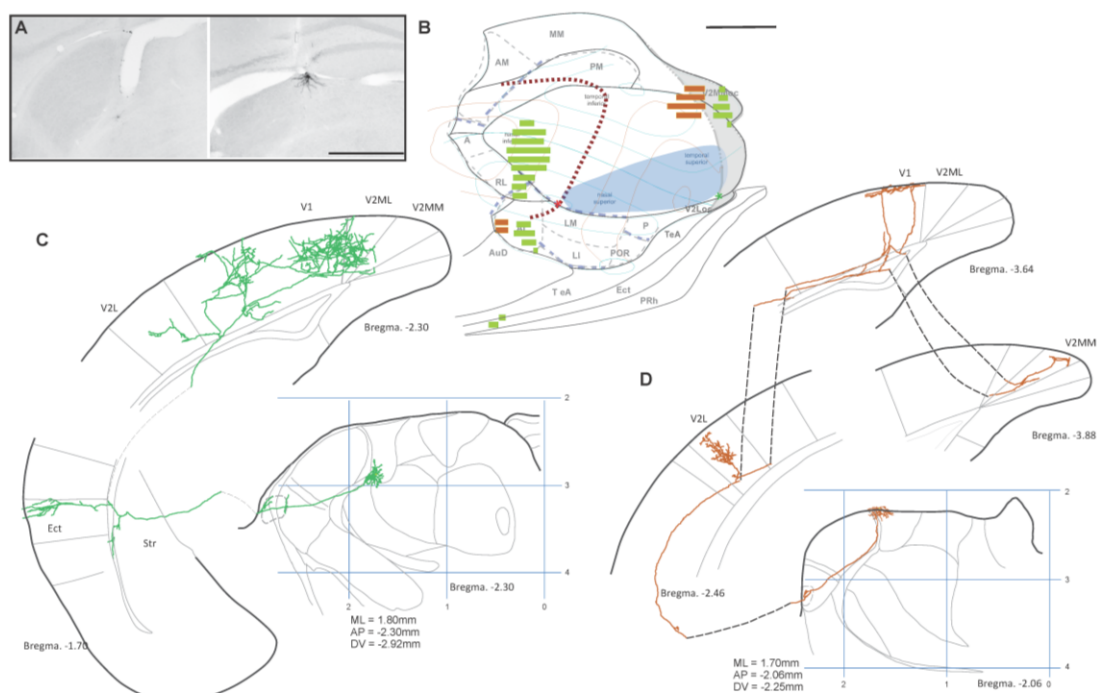


Figura 95. Distribución subcortical y cortical de los axones de dos neuronas aisladas transfectadas con viriones del vector Sinbis-GFP localizadas en distintas regiones del núcleo LPL de dos animales distintos. (A) Se muestran dos microfotografías que señalan la localización de ambas neuronas en una sección sagital del tálamo de ratón tras su revelado inmunohistoquímico. (B) Mapa plano de la superficie cortical en el que se ha representado la localización de ambas arborizaciones axónicas corticales mediante los dos colores asignados a las dos neuronas (verde y marrón). También se han incluido varios grados de elevación y azimuth, así como la extensión cortical del campo binocular como se indica en la leyenda. (C, D) Reconstrucciones bidimensionales bajo cámara clara del dominio somatodendrítico, colaterales en el núcleo reticular talámico (Rt) y el Str, y la longitud completa del axón de cada una de las neuronas por separado. Se indica la situación del soma y de la arborización terminal en secciones coronales talámicas, añadiendo sus coordenadas AP, ML y DV asociadas a la posición del soma. Barra de calibración de 500µm (A) y 1mm (B). Ver lista de abreviaturas.

Finalmente, en este trabajo de tesis se han incluido las dos últimas neuronas reconstruídas localizadas en distintos niveles antero-posteriores del LPMR (Figura 96C y D). En esta figura, tenemos la oportunidad de apreciar el fenotipo TC multiespecífico de estas neuronas alcanzando múltiples áreas corticales alejadas entre sí, mostrando distintos patrones laminares en cada una (simbolizados en un determinado código de colores). Hay que destacar que la neurona localizada en niveles más rostrales (color magenta, 96D) presenta una mayor complejidad en el número de sus dianas corticales y subcorticales. Mientras que la neurona

situada en niveles caudales (color verde, 96C), muy próxima al borde con LPMC, muestra una distribución tangencial muy afín a la de éste núcleo, alcanzando principalmente áreas visuales asociativas y temporales.

Estos resultados obtenidos a nivel de neurona aislada indican claras diferencias en las proyecciones TC entre los núcleos dLGN y las divisiones del complejo LP, como ya se ha descrito en detalle a nivel poblacional en apartados anteriores.

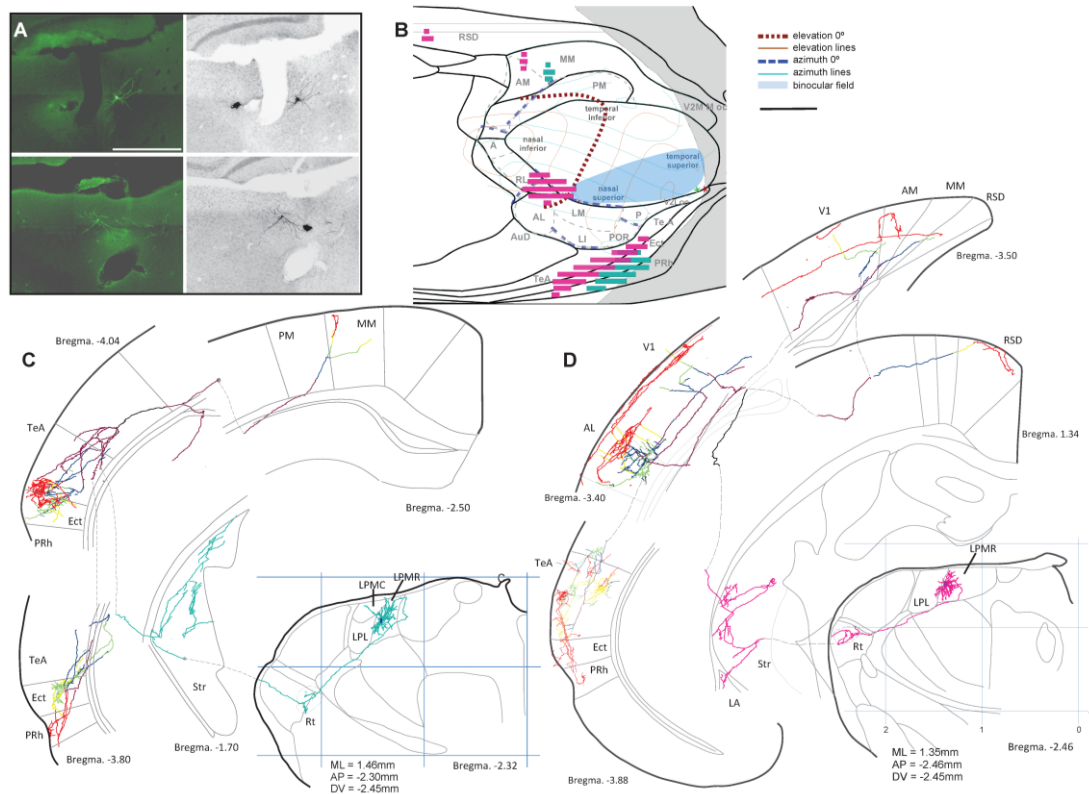


Figura 96. Distribución subcortical y cortical de los axones de dos neuronas aisladas transfectadas con viriones del vector AAV localizadas en regiones anterior (D, magenta) y posterior (C, verde) del núcleo LPMR en un mismo animal. (A) Microfotografías que muestran la posición del soma de ambas neuronas infectadas por el vector AAV-GFP, en fluorescencia y tras su revelado inmunohistoquímico, en una sección sagital talámica. (B) Mapa plano cortical donde se muestra la distribución de las arborizaciones axónicas corticales procedentes de ambas neuronas en verde (neurona C) y en magenta (neurona D). (C) Reconstrucción tridimensional de una neurona localizada en niveles posteriores de LPMR. En ambas reconstrucciones se indica la posición exacta del soma mediante tres coordenadas, y se ha mantenido el código de colores seleccionado durante la reconstrucción para designar el marcado en cada lámina cortical: capa 1 (rojo), capa 2/3 (amarillo), capa 4 (verde), capa 5 (azul) y capa 6 (morado). También se observa, además de tres arborizaciones corticales, un parche en el Rt y el Str. (D) Reconstrucción tridimensional de una neurona situada en niveles rostrales de LPMR. Se mantiene el código de colores para representar el patrón laminar de las cinco arborizaciones corticales que presenta. También se representa un campo terminal en el Str y el Rt. Barra de calibración de 500µm (A) y 1mm (B). Ver lista de abreviaturas.

Ya hemos mencionado en apartados anteriores la gran importancia de las varicosidades axónicas, al tratarse de componentes esenciales para transmisión sináptica actuando como elementos presinápticos. Por lo que resulta extremadamente relevante la posibilidad de estimar

el número de varicosidades axónicas en neuronas aisladas de las que sabemos con seguridad que todo el marcado axónico observado en corteza se ha originado a partir de ella. Esto nos permite adquirir una noción del potencial sináptico que posee una única neurona en cada área y capa cortical que inerva. Es por esto, que hemos estimado el número de varicosidades totales en axones corticales para cada neurona aislada analizada mediante estereología. Así como la longitud total de axón en las diversas áreas corticales que inerva, cuyo valor se obtuvo directamente tras la reconstrucción completa de la neurona mediante el *software* Neurolucida y de forma paralela se estimó mediante métodos estereológicos insesgados. Para estudio de la morfología somato-dendrítica de cada célula se consideraron los parámetros número de espinas dendríticas y longitud dendrítica total obtenidos mediante Neurolucida. Todas estas cuantificaciones aparecen recogidas en la Tabla 16.

Inicialmente, los datos de mayor interés para intuir el potencial sináptico de estas neuronas son los parámetros de medida sobre los axones corticales. El número de varicosidades axónicas TC entre las 4 neuronas analizadas es muy variable, aunque es relevante señalar que el mayor número de varicosidades lo presenta la proyección muy focal de una neurona del dLGN a V1. Mientras que, sorprendentemente, el menor número de varicosidades aparece en una neurona del LPL que envía colaterales para inervar dos áreas corticales distintas de forma independiente. Estos resultados coinciden con las medidas obtenidas de la longitud total de axón en corteza.

Tabla 16. Resumen de los parámetros morfológicos del dominio somatodendrítico y de los campos terminales axónicos considerados en este estudio para las cuatro primeras neuronas aisladas descritas anteriormente. Así se ha cuantificado mediante el *software* Neurolúcida la longitud dendrítica total, el número de espinas dendríticas y la longitud axónica cortical total. Mientras que el número de varicosidades axónicas y la longitud total de axones corticales se ha estimado mediante el métodos estereológicos insesgados también.

Caso de estudio	Neurolúcida			Estereología
	Longitud Dendrítica Total	Número de Espinas Dendríticas	Longitud Axónica Total en Corteza	Número de Varicosidades
Soma dorsal DLG (V1)	4244 mm	-	22990 mm	11049
Soma ventral DLG (V2L)	7928 mm	158	11854 mm	5168
Soma LPLR	4865 mm	203	16288 mm	3742
Soma LPLC	4793 mm	28	45395 mm	7755

V DISCUSIÓN

Con este trabajo aportamos el primer estudio sistemático a nivel poblacional y de célula única del sistema de proyección tálamo-cortical originado en cada uno de los cuatro núcleos del tálamo visual (dLGN, LPL, LPMC, LPMR) del ratón. Los datos obtenidos indican que las neuronas TC localizadas en cada uno de estos núcleos presentan distintos tipos de estrategias en la morfología axónica. De modo congruente con la clasificación de las neuronas de proyección talámicas que hemos propuesto recientemente (Clascá et al. 2016), vamos a encontrar varios tipos. Las neuronas del dLGN presentan la típica arquitectura axónica de tipo *específico*, proyectando de forma focal únicamente al área cortical visual primaria. En el LPL y LPMC las neuronas presentan una arquitectura axónica de tipo *multiespecífico*. Así, las neuronas TC de LPL inervan de forma restringida cortezas visuales primarias y asociativas así como en algunos casos estructuras subcorticales; mientras que las neuronas del LPMC arborizan en áreas subcorticales, como el Str y la LA, y corticales, no sólo unimodales visuales sino también áreas bi o multimodales, como es el caso de muchas áreas temporales, y sus axones van a terminar de forma focalizada en 3 o 4 áreas próximas entre sí. Por último, las neuronas del LPMR tienen en cambio una arquitectura axónica de tipo *inespecífico* pues, además de inervar centros subcorticales como el Str y la LA, extienden ampliamente sus ramas axónicas a través de la capa 1 y la capa 6, lo que se aprecia especialmente en los experimentos de neuronas aisladas donde una sola neurona proyecta a una multitud de dianas corticales. Mediante este particular patrón de inervación TC, el LPMR podría estar participando no sólo en circuitos corticales visuales sino redes subcorticales y corticales relacionadas con otras modalidades sensoriales, motoras o asociativas de alto nivel.

Cada uno de estos diversos morfotipos de neuronas TC ha sido diseñado y perfeccionado a lo largo de la evolución para adaptarse de la forma más eficaz a la función que posee, en relación con el procesamiento y vehiculización de determinados aspectos del estímulo visual. La formación de estas vías paralelas de procesamiento, es un rasgo común a muchos sistemas sensoriales en mamíferos, cuyo fin es el de especializarse en la extracción de información precisa relevante del entorno que influye en la percepción visual coherente y el comportamiento generado por la misma (Callaway 2005).

Hemos observado diferencias entre estos sistemas paralelos de proyección TC hacia áreas visuales a través del marcado de micropoblaciones de neuronas con trazadores en cada uno de los núcleos talámicos mencionados. Estos resultados se han obtenido mediante el análisis detallado del patrón de distribución tangencial, en función del tipo de dianas corticales y subcorticales que poseen, y laminar, en función de las capas corticales donde forman arborizaciones terminales axónicas, e incluso tras analizar el tamaño de las varicosidades

axónicas en algunas de estas áreas visuales en láminas determinadas. Las micropoblaciones originadas en algunos núcleos talámicos visuales van a presentar una organización retinotópica más o menos precisa, la cual hemos contrastado con los datos electrofisiológicos existentes. En otros casos, a pesar de no observarse una topografía clara, sí aparece una organización en sectores hodológicos dentro del núcleo, cuyas neuronas muestran una mayor o menor preferencia por determinadas dianas corticales.

Al igual que en otros sistemas sensoriales, el núcleo del tálamo visual estudiado con mayor detalle en distintas especies de mamíferos, y en roedores, ha sido el dLGN, cuyas neuronas proyectan de forma muy focalizada a capas intermedias de un área cortical primaria. Sin embargo, recientemente se ha incrementado el interés por un complejo nuclear que en roedores siempre se ha considerado tan sólo un primordio del inmenso complejo pulvinar que poseen los primates, el complejo LP. En los últimos años se han publicado casi todos los trabajos existentes en la literatura sobre las divisiones y hodología del complejo lateral-posterior en ratones, especialmente de sus núcleos LPL y LPMC (Cruz-Martín et al. 2014; Gale y Murphy 2014; Tohmi et al. 2014; Allen et al. 2016; Roth et al. 2016; Zhou et al. 2017), y en base la amplia diversidad morfológica y funcional que va a presentar cada una de sus divisiones, algunos comienzan a denominarle complejo pulvinar del ratón (Baldwin et al. 2017). Con nuestro estudio aportamos datos más precisos sobre las conexiones corticales y subcorticales de este complejo.

1 CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS

1.1 Modelo animal y área del estudio

A lo largo de la Introducción hemos argumentado la gran relevancia del ratón como modelo de estudio de los principios de organización de muchos sistemas sensoriales de mamíferos. Sin embargo, las reticencias ante el uso de este modelo animal cuyo sistema visual no es tan especializado como el de otras especies, han dado lugar a un retraso en la aparición de estudios del sistema visual en el ratón. Sin embargo, en la actualidad se ha posicionado como uno de los modelos predilectos para el estudio de la visión (Huberman y Niell 2011).

La disposición circular y contigua de todas las pequeñas cortezas visuales extraestriadas alrededor del extremo del polo occipital en los ratones, junto a la dificultad de acceder especialmente a las regiones occipitales más ventrales y mediales, y el hecho de que casi la

totalidad de los trabajos anatómicos del sistema TC visual se han realizado en el plano coronal u horizontal, hacen que aún existan varias áreas corticales visuales que han sido menos estudiadas por su situación. Por todo ello, decidimos utilizar el plano sagital para nuestro estudio de las proyecciones TC dirigidas principalmente a estas áreas occipitales. En base a la delimitación de las áreas corticales en secciones sagitales confeccionamos el mapa plano de la superficie cortical del ratón a partir del atlas de ratón de Franklin y Paxinos (2008) y del atlas de secciones sagitales del polo temporal desarrollado por nosotros como parte de este trabajo.

En relación al establecimiento de los límites anatómicos entre los cuatro núcleos del estudio, el uso del plano sagital conlleva dificultades a la hora de comparar nuestra delimitación, realizada a partir de un amplio número de distintas técnicas histo- e inmunohistoquímicas sobre secciones sagitales, con las delimitaciones propuestas en otros estudios realizados sobre secciones coroneales. Gracias al uso del atlas tridimensional de resonancia magnética funcional del ratón y del programa informático IKT-SNAP, hemos podido introducir gran cantidad de información de estudios morfo-funcionales coroneales para precisar al máximo la delimitación del complejo LP que presentamos. La delimitación precisa de los tres núcleos del LP es de vital importancia para un estudio anatómico de este tipo, así como para entender y poder clasificar los tipos de arquitecturas axónicas que observamos en la corteza, tanto en nuestro trabajo como en otros. Uno de los trabajos más relevantes sobre el complejo LP en rata, por tratarse del único estudio en la literatura que describe la morfología axónica de neuronas individuales, es el de Nakamura et al. (2015) donde se describen 10 neuronas de proyección TC del complejo LP. Sin embargo, para la delimitación de estos núcleos los autores se basan exclusivamente en la distribución de vGluT2 en los núcleos del LP, lo que, especialmente en la región caudal receptora de aferentes coliculares, puede inducir a errores en la delimitación del LPMC y el LPL. El marcado de vGluT2 es principalmente denso en la porción caudal del LP, que los autores identifican como el núcleo LPMC, sin embargo esta región caudal no sólo engloba este núcleo, sino parte del LPL también, por lo que las neuronas que analizan y muestran de esta región poseen distribuciones axónicas TC contradictorias, bajo nuestro punto de vista. Los últimos estudios del LPMC (Zhou et al. 2017) abordan esta cuestión y buscan nuevas técnicas que posibiliten la delimitación precisa de los componentes del LP caudal. En nuestro caso, hemos utilizado para la delimitación del LPMC y LPL, además de las características morfológicas de los terminales marcados con vGluT2, también hemos utilizado la característica inmunoreactividad que presentan los núcleos LPMC y LPMR frente a la calretinina (CR). Así los terminales marcados con vGluT2 presentan botones terminales de mayor tamaño en LPMC (incluso mayor que los encontrados en dLGN) y más pequeños en LPL. Por el contrario, el núcleo LPMR presenta también inmureactividad

frente a CR, posee botones más pequeños marcados con vGluT2 que contrastan en su límite medial con los de mayor tamaño del CL. El límite medial se puede trazar también gracias a la elevada actividad acetilcolinesterasa que presentan los núcleos MD y CL. En relación a los límites rostral, con LD, y caudal, con APT, no hemos encontrado diferencias con lo existente en la literatura, ya que son fácilmente reconocibles mediante CyO o inmunomarcado con CB. En cualquier caso, la delimitación de los núcleos del LP es un aspecto a contrastar siempre previo a la interpretación de los estudios consultados en la literatura.

1.2 Marcado y análisis retrógrado y anterógrado de proyecciones axónicas a nivel poblacional

Para abordar el estudio anterógrado a nivel de población neuronal dentro de núcleos tan reducidos como los que forman el complejo LP, inicialmente escogimos como trazador el BDA de 10 KDa realizando microdepósitos de poco diámetro, que nos proporcionasen una resolución de muestreo acorde a la escala del mapa retinotópico preciso del dLGN del ratón, probando para ello distintos parámetros de inyección (ver Materiales y Métodos). Este trazador axónico junto con el revelado siguiendo el método de la glucosa-oxidasa intensificada con níquel, nos dio buen resultado para el marcado de los axones de proyección originados en dLGN, LPL y LPMC; sin embargo, en el caso del análisis de los terminales axónicos altamente ramificados y de poco calibre procedentes de regiones del LPMR, localizados en la capa 1 cortical de gran número de áreas corticales extremadamente alejadas entre sí, ofrecía un aspecto típico punteado y muy ligeramente marcado que ponía en duda la posibilidad de haber marcado completamente cada una de las neuronas de la población. Es por esto que decidimos usar un vector viral de tipo AAV a la mínima dilución que produjera un marcado sistemático neuronal y utilizando los mismos parámetros de microinyección que con el BDA (Scheyltjens et al. 2015). De esta forma conseguimos rellenar de forma fiable cada una de las neuronas de la micropoblación infectada por el virión, gracias a la calidad del marcado con el vector AAV, tanto en áreas con gran densidad como en áreas que presentaban escasos terminales axónicos era muy superior al trazado con BDA. Esto se ha discutido en trabajos que defienden que el marcado anterógrado, e incluso la pequeña proporción de somas retrógradamente marcados, es similar con ambos trazadores (Wang et al. 2014). Sin embargo, estos autores sólo comparan ambos métodos en conexiones cortico-corticales en el mismo hemisferio entre áreas no muy lejanas (MO y S1), que presentan menor complejidad que el patrón de conexiones TC inespecífico del LPMR y menores distancias de transporte del trazador BDA.

Además, realizamos también depósitos con BDA con el fin de realizar sobre estos experimentos estudios cuantitativos. Esto es debido a que es el trazador axónico ideal para el análisis del tamaño de varicosidades sinápticas mediante el microscopio óptico y electrónico (Porrero 2016; Córdoba-Claros 2017; Rodríguez-Moreno et al. 2017), por lo que nos permite establecer comparaciones entre otros sistemas sensoriales con nuestros resultados. Uno de los parámetros cuantitativos de la conectividad a nivel poblacional de estos distintos tipos de arquitecturas TC es el tamaño de las varicosidades axónicas en un área y capa concreta de sus puntos de arborización cortical aplicado a un núcleo modelo FO, el dLGN, y otro HO, el complejo LP (Sherman y Guillery 2002). La relevancia de este parámetro es debida a que se ha observado una correlación entre el tamaño de las varicosidades en los axones glutamatérgicos y la eficacia postsináptica en las conexiones que establecen (Pierce y Lewin 1994; Viaene et al. 2011a, 2011b; Marion et al. 2013). A pesar de las limitaciones en resolución a este nivel que presenta la microscopía óptica, que sólo permite una medición aproximada del área de proyección máxima de la varicosidad; datos recientes de nuestro laboratorio indican que dicha medición presenta una clara correlación con el tamaño medido mediante microscopía electrónica de corte seriado y la posterior reconstrucción tridimensional del botón sináptico (Rodríguez-Moreno et al. 2017). A nivel metodológico, el aspecto de mayor importancia para obtener valores válidos del tamaño de estas varicosidades axónicas es ser consistente con la forma de realizar el perfil del área de la varicosidad, que todas las mediciones fueran realizadas por el mismo observador, para que el contorno se dibujase siempre en el plano focal en el que se vieran sus bordes con máxima nitidez.

Otro de los avances metodológicos que introducimos con este trabajo es la creación de un mapa plano cortical a partir de las mediciones de la superficie cortical de cada área representada sobre secciones sagitales de los atlas Franklin y Paxinos (2008) complementado con el atlas del Allen Brain Institute y la bibliografía actual descriptiva, mediante técnicas anatómicas o electrofisiológicas, de subregiones dentro de estas áreas corticales. Además, debido a la carencia en estos dos atlas consultados de las secciones sagitales correspondientes con el polo temporal, donde se hallan múltiples áreas diana de los núcleos del complejo LP, fue un requisito necesario la realización de un atlas donde se delimitaran de forma precisa y consistente, gracias a una extensa batería de tinciones histo- e inmunohistoquímicas, estas áreas corticales de interés. Ambos retos asumidos para el análisis y representación de nuestros resultados de mapeo de la distribución tangencial de terminales axónicos, nos han permitido el rápido establecimiento de comparaciones de las proyecciones TC entre los núcleos estudiados, así

como el descubrimiento en algunos de estos núcleos de la existencia o no de una disposición retinotópica de sus poblaciones neuronales.

1.3 Marcado y análisis de neuronas únicas

Una de las cuestiones todavía no resueltas sobre la arquitectura celular de las redes TC es la existencia y prevalencia de colaterales axónicas y, con ello, la posibilidad de que una misma neurona talámica inerve múltiples estructuras corticales y subcorticales. La principal aproximación metodológica indirecta utilizada para resolver esta cuestión ha sido el doble marcado retrógrado que, sin embargo, es poco sensible y, por ello, muy proclive a la subestimación. Esto es debido a que esta técnica conlleva varios inconvenientes que ponen en duda los resultados obtenidos al utilizarla, el principal es que en función del trazador axónico escogido varía la capacidad de captación por el terminal axónico y de transporte por el axón hasta el soma, por lo que utilizando los mismos parámetros de inyección y tiempo de supervivencia, no todos los trazadores proporcionan resultados similares y concluyentes acerca de la existencia de colaterales axónicas.

La reciente introducción de vectores virales modificados genéticamente para aumentar su eficacia en la transfección y replicación de su genoma en el interior de la célula, ha permitido el trazado completo de axones de neuronas aisladas sin importar el grado de complejidad y longitud total de los mismos. Sin embargo, pese a su elevada resolución, este abordaje es poco eficiente debido a la dificultad de marcar una neurona aislada o un tipo neuronal concreto en un área concreta, especialmente en núcleos talámicos tan pequeños como los del complejo LP. Para resolver este problema se presentan tres posibles estrategias, una es el desarrollo de un vector viral específico que infecte un tipo neuronal concreto (Wouterlood et al. 2014) o bien un virus transináptico que se active mediante otro virus *helper* que posea esta secuencia de activación y ambos se transporten de forma específica hacia la misma diana, por lo que se activará una única población neuronal que proyecte a esas dos regiones donde se ha realizado el depósito (Callaway y Luo 2015). Por último, la tercera posibilidad que se ha desarrollado y perfeccionado en nuestro laboratorio es la electroporación *in vivo* específica de la secuencia génica del vector viral elegido en una única neurona talámica (Porrero et al. 2016), lo que permite el marcado completo de neuronas profusamente ramificadas y su reconstrucción. Y así observar si las arquitecturas axónicas de estas neuronas aisladas eran congruentes con los patrones de distribución de las arborizaciones terminales a nivel micropoblacional. En nuestro

caso, hemos adaptado y perfeccionado el método de la electroporación *in vivo* no sólo de RNA sino también de DNA plasmídico procedente del vector AAV-GFP.

Finalmente, seleccionamos un método de reconstrucción tridimensional mediante el uso del programa Neurolucida, que además nos permite obtener parámetros cuantitativos de la conectividad TC como la longitud, número de espinas dendríticas o la longitud total de axón dentro de una determinada estructura como la corteza cerebral. Aunque en todos los casos, se ha realizado la reconstrucción completa previa bajo cámara clara de cada neurona individual marcada. Debido a la gran inversión de tiempo que exige la reconstrucción tridimensional de las neuronas con Neurolúdic, en dos casos (Figura 95) hemos presentado su trazado sólo mediante cámara clara. Posteriormente, contrastamos estos resultados obtenidos de longitud axónica cortical por capa y además estimamos el número de varicosidades corticales mediante estereología. Este último parámetro es fundamental para conocer la funcionalidad de estas morfologías TC, ya que las varicosidades de los axones glutamatérgicos guardan relación con el número de sinapsis (Markov y Kennedy 2013). Observamos diferencias significativas en los resultados de longitud de axón total obtenidos mediante estos dos métodos. El trazado con Neurolucida requiere que los puntos que conformarán el modelo tridimensional de la neurona se sitúen exactamente sobre el axón que está siendo reconstruido, mientras que la estimación mediante el muestreo con planos isotrópicos virtuales tan sólo requiere llevar a cabo un conteo siguiendo unos rigurosos criterios que aseguran su alta precisión. Por todo ello, finalmente escogimos el valor estimado con estereología. El método de reconstrucción mediante Neurolucida también fue el elegido en el único estudio de reconstrucción tridimensional de neurona única en el complejo LP de rata (Nakamura et al. 2015), lo que nos permitió observar que las arquitecturas axónicas en ambas especies de roedores son comparables.

2 ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL dLGN Y EL COMPLEJO LP

En la actualidad, uno de los principales requisitos para la construcción de modelos computacionales de circuitos neuronales que sean capaces de predecir el comportamiento del sistema en conjunto, es la obtención de datos cuantitativamente precisos tanto del número celular y posición espacial de cada población neuronal implicada en el circuito, como de aspectos morfológicos y fisiológicos del dominio somatodendrítico, axónico y sináptico de estas células.

Siendo el conjunto de estos datos lo que nos permite entender la compleja estructura y función de estas redes neuronales (Hill y Tononi 2004; Markram et al. 2015).

A pesar de ello, apenas aparecen datos previos descritos en la literatura acerca del volumen y número de neuronas en el núcleo dLGN y el complejo LP en el ratón C57/BL6 adulto de forma específica. Los trabajos estereológicos comparando el número de neuronas en dLGN de distintas cepas y sexos de ratón (Seecharan et al. 2003) y en distintas edades postnatales hasta P10 (Dursun et al. 2013) arrojan valores similares a los obtenidos en este trabajo, en torno a las 21 mil neuronas. Con la diferencia de que nuestros datos han sido tomados de únicamente machos de un intervalo de edad muy restringido (entre 60 y 80 días) y fueron realizados por dos observadores independientes. En relación al complejo LP, éste se trata del primer trabajo que estima estos dos parámetros cuantitativos en el ratón. Nuestros datos muestran que este complejo nuclear, de mayor volumen en relación al dLGN, contiene alrededor de 35000 neuronas, un tercio más que el dLGN. Pero en términos de densidad celular, en ambas regiones talámicas estudiadas es bastante similar.

3 SISTEMA DE PROYECCIÓN DEL NÚCLEO dLGN

Tanto el dLGN como el complejo LP/pulvinar se pueden considerar los órganos talámicos del sistema visual de mamíferos, los cuales, como hemos estudiado son relativamente similares a nivel de composición (neuronas de proyección e interneuronas) y densidad neuronal (Ottersen y Storm-Mathisen 1984; Arcelli et al. 1996; Li et al. 2003; Seecharan et al. 2003). Sus principales diferencias se hallan en las particularidades de su proyección TC.

Inicialmente, nuestros experimentos de marcado retrógrado en V1 (Figura 72) nos permitieron observar la marcada retinotopía de este núcleo sobre secciones sagitales, de una forma en la que no se había mostrado antes, pero que coincidía completamente con los mapas retinotópicos de los trabajos de Piscopo et al. (2013) y Grubb y Thompson (2003). Con la particularidad de que en nuestro caso carecíamos de depósitos en el extremo dorsal de V1, esta región cortical coincide con el vacío de somas retrógradamente marcados en las regiones ventrales y posteriores de las secciones sagitales más laterales. Sin embargo, si pudimos comprobar la localización siempre dorsal en el dLGN de las poblaciones neuronales que proyectan a la región binocular de V1, abarcando gran parte de la porción *shell* y *core* dorsal.

Estos experimentos han sido, así mismo, de gran valor especialmente en relación a los depósitos localizados ventralmente en el polo caudal (Figura 72, color amarillo). Estos depósitos muestran que a estas regiones de gran dificultad de acceso y por ello de menor estudio, llegan terminales axónicos no sólo del dLGN, sino de todos los núcleos del complejo LP, de forma especialmente abundante desde el LPL y el LPMR.

Por otro lado, los depósitos de trazador retrógrado en áreas visuales extraestriadas revelan que las neuronas del dLGN localizadas en los niveles más mediales del núcleo (Figura 97), limitando con LPL, van a proyectar a regiones visuales asociativas (LM, P y V2MMoc principalmente), cuyo patrón laminar, así como la posibilidad que sea su única diana de proyección o que estén innervando el área mediante una colateral axónica, sólo se puede comprobar mediante experimentos de marcado anterógrado y de neurona única. Los estudios sobre proyecciones del dLGN hacia áreas extraestriadas en roedores son relativamente antiguos y se usan métodos de trazado axónico que presentan una baja resolución (Ribak y Peters 1975; Hughes 1977; Dürsteler et al. 1979; Olavarria 1979; Coleman y Clerici 1980; Perry 1980; Torrealba et al. 1984; Antonini et al. 1999), por lo con este trabajo investigamos esta cuestión en profundidad.

Los estudios de marcado anterógrado micropoblacional en el dLGN, reafirman la retinotopía existente en este núcleo mediante el estudio de la distribución tangencial de sus proyecciones TC. Pero es el estudio de su patrón laminar el que nos indicó pequeñas diferencias en la densidad relativa de terminales en capas superficiales (1-2) e intermedias (3-4) en regiones monoculares y binoculares de V1. Por otro lado, se aprecia mayor abundancia de terminales en capas superficiales en las neuronas que arborizan en regiones de V1 limitantes con las áreas extraestriadas LM, V2MMoc y P, aunque por supuesto la mayor densidad de terminales siempre se halla en capas intermedias de V1. Una de las razones de estos pequeños cambios en la distribución en las regiones de V1 limítrofes con áreas visuales asociativas, frecuentemente localizadas en el segmento binocular de V1, puede ser que los axones se valgan de las capas superficiales para alcanzar las áreas extraestriadas.

Nuestros resultados en términos de neuronas aisladas en el dLGN, revelan la existencia de neuronas localizadas en el borde medial del núcleo que van a alcanzar únicamente un área visual extraestriada sin extenderse a V1, con el típico patrón focalizado en un área de las neuronas “específicas”. Por ello, la cuestión de la innervación de más de un área visual mediante colaterales desde el dLGN no ha podido ser contestada de forma rotunda todavía, necesitaríamos la reconstrucción completa de más neuronas del dLGN para asegurarlo. Por último, con respecto

a la cuestión de la aparición de variantes morfológicas en el diseño del dominio somatodendrítico de las neuronas del dLGN (Krahe et al. 2011), estableciendo homologías con las halladas en carnívoros y primates, con nuestros datos de neurona única no podemos aceptar o rechazar esta afirmación, ya que ambas neuronas localizadas en el dLGN, presentan una morfología somatodendrítica más afín a la del tipo Y.

4 SISTEMA DE PROYECCIÓN DEL NÚCLEO LPL

4.1 Dianas corticales

A pesar de no tratarse de un núcleo FO, como el dLGN, cuya principal aferencia proviene únicamente de estructuras subcorticales, a través de nuestros experimentos de trazado retrógrado, hemos comprobado que el LPL es el núcleo del complejo LP que mantiene una mayor organización retinotópica, aunque en ningún caso comparable a la del dLGN. Esta representación topográfica de la información visual se describe a grandes rasgos en los trabajos anatómicos y electrofisiológicos de Tohmi et al. (2014) y Allen et al. (2016). Los depósitos de trazador retrógrado en V1 (Figura 72) muestran una organización parcheada en secciones laterales del LPL, similar a la observada en el dLGN, que se va desdibujando a medida que avanzamos hacia niveles mediales. Así mismo, en consonancia a lo observado en el caso del dLGN, vemos que se mantiene una región dorsal del núcleo donde se agrupan los somas neuronales que inervan el segmento binocular de V1. El mantenimiento en cierta medida de los mapas oculares y retinotópico, puede explicarse por la conservación fiel de la topografía, así como la identidad del origen ocular ipsi- o contralateral, en sus principales aferencias ipsilaterales desde las capas superficiales del SC (SGS y SO) (Langer y Lund 1974; Crain y Hall 1980; Donnelly et al. 1983; Sugita et al. 1983; Abramson y Chalupa 1988; Lane et al. 1993; Chomsung et al. 2008; Gale y Murphy 2014). Otra de estas aferencias se origina en las capas 5 y 6 de áreas corticales visuales primaria y asociativas que contribuyen al mantenimiento de la retinotopía en LPL, como es el caso de la proyección de la capa 6 inferior de V1 al LPL, pero no ocurre así en todos los núcleos del complejo LP (Mason y Groos 1981; Schober 1981; Bourassa y Deschênes 1995; Li et al. 2003; Tohmi et al. 2014). Por último, la retina emite una pequeña proyección mayoritariamente dirigida a regiones rostrales del LPL organizada retinotópicamente (Yamadori 1977; Perry y Cowey 1982; Ahmed y Rahi 1985; Ling et al. 1997; Morin y Studholme 2014), estas tres aferencias van a permitir al LPL conservar una cierta organización topográfica.

Los experimentos de trazado retrógrado desde las distintas áreas visuales asociativas muestran una clara distribución preferente en el eje antero-posterior. Vemos que las áreas visuales extraestriadas se disponen en forma de anillo en torno a V1, y las áreas localizadas en el borde medial del anillo (PM, AM, MM, V2MMoc) reciben principalmente proyecciones de las poblaciones neuronales situadas en regiones anteriores y mediales de LPL (Figura 76). Mientras que las áreas visuales asociativas laterales (LM, RL, AL, LI, P, V2Locc) van a proyectar de forma menos restringida que las mediales dentro del LPL, pero mostrando una cierta preferencia por regiones caudales del núcleo (Figura 75), limitantes con el LPMC, cuya principal proyección serán estas áreas también.

Tras la observación de esta distribución tan característica de las neuronas dentro del LPL en función de sus eferencias hacia las áreas visuales asociativas laterales y mediales, que no había sido descrita previamente, pasamos a corroborarla mediante el marcado anterógrado de micropoblaciones neuronales. En el anexo 2, que incluye el resumen de todos los casos, comprobamos que los depósitos caudales (AAV26HD, R275HD, R273HD, R248HD), aunque en algunos casos con contaminación en el dLGN, presentan una clara preferencia en sus proyecciones corticales por áreas visuales asociativas laterales (también observado en Tohmi et al. (2014); mientras que en depósitos rostrales, como R286HD, la distribución tangencial de sus proyecciones queda restringida a áreas extraestriadas mediales. Todo ello confirma esta particular topografía dentro del LPL.

Además, si seleccionamos los depósitos de trazador anterógrado restringidos en su totalidad al LPL (AAV35HI, R248HD, R286HD), podemos analizar de forma fiable el patrón laminar que presenta en las distintas áreas corticales diana. Observamos que principalmente inerva V1 arborizando en las capas 1 y 5, mientras que a las áreas visuales extraestriadas, independientemente de su situación lateral o medial a V1, las inerva mostrando cierta preferencia por la capa 1 y capas intermedias (3-4), acorde con el descrito por (Nakamura et al. 2015; Zhou et al. 2017). Algunas de estas áreas visuales asociativas se ha estudiado en mayor profundidad como el área PM, la cual se ha relacionado con el procesamiento visual y reconocimiento de escenas durante la navegación espacial en ratones (Roth et al. 2012).

En algunos casos, hemos observado proyecciones de poblaciones del LPL invirtiendo áreas corticales circundantes a las cortezas visuales asociativas (Figura 97), como son la corteza parietal posterior lateral (LPtA) y medial (MPtA) y/o RSD, exhibiendo un patrón laminar preferentemente dirigido a capa 1, en poblaciones en regiones mediales del LPL rostral. Inicialmente, en la literatura aparece descrita una conexión entre regiones mediales del LP

(LPMR) y ambas áreas corticales en otras especies de roedores (Hughes 1977; Chandler et al. 1992; Reep et al. 1994; Kamishina et al. 2009), pero posteriormente se ha comprobado la existencia de esta proyección también desde LPL mediante marcado de neuronas aisladas del LPL (Nakamura et al. 2015). En estas áreas retroespleniales se encuentran neuronas que responden a direcciones preferentes de la cabeza, relacionando este núcleo, y el LPMR, con tareas de aprendizaje y memoria espacial y contextual, así como aspectos sensorio-motores de la navegación espacial del sujeto (Vann et al. 2009; Czajkowski et al. 2016; Yamawaki et al. 2016). Especialmente en las neuronas aisladas del LPMR (Figura 96) podemos observar que la neurona que inerva RSD emite una colateral al Str dorsal, por lo que comprobamos la gran relación entre estos dos centros. Esto explica el papel atribuido a RSD en detectar las inconsistencias entre el movimiento propio del individuo (Cho y Sharp 2001; Roth et al. 2016) y el movimiento del entorno en el que se desplaza y en problemas visuoespaciales en pacientes con Parkinson (Kordys et al. 2017), gracias a sus conexiones con el complejo LP. También hemos observado marcado en cortezas temporales, en depósitos del LPL caudal colindantes con el LPMC, también mostrando un patrón de inervación preferente en la capa 1, coincidiendo de igual forma con lo observado en otros roedores (Chomsung et al. 2008).

4.2 Dianas subcorticales

La aparición con baja frecuencia, en nuestro caso, de arborizaciones en niveles caudales del Str dorsolateral también ha sido ampliamente descrita en la rata mediante marcado axónico con BDA (Kamishina et al. 2008), así como su marcada conservación de la retinotopía en esta proyección estriatal (Erro et al. 2002; Cheatwood et al. 2003). Estos lugares de terminación en el Str dorsolateral van a coincidir con los lugares de proyección de áreas visuales y visuomotoras (Updyke 1993; Harting et al. 2001; Cheatwood et al. 2005), influyendo directamente en movimientos relacionados con la atención hacia determinados estímulos visuales.

Tanto en los casos de arborizaciones en el Str, como en múltiples áreas corticales, se retoma la cuestión de si estas proyecciones se originan en poblaciones neuronales independientes o a través de colaterales axónicas de una misma neurona. Como hemos comentado, es indispensable para comprobarlo el marcado completo de neuronas aisladas en el LPL, a pesar de los trabajos de doble marcado retrógrado que sugieren la posibilidad de la existencia de colaterales mediante las que inervan el Str (Takada 1992). En las Figuras 94 y 95, mostramos 4 neuronas localizadas en distintas regiones del LPL, apareciendo en una de ellas una colateral que inerva el Str, con lo que podemos aceptar la propuesta de Takada (1992). En cuanto a la

distribución de sus proyecciones corticales, estas neuronas nos permiten afirmar que las neuronas del LPL poseen, al menos, entre 1 y 4 puntos de ramificación cortical en los que se emiten colaterales axónicas para inervar varias áreas corticales, en algunos casos muy alejadas entre sí, desplazándose en algunos casos a través de la capa 6 o, en menor medida para el caso del LPL, utilizando la lámina cortical 1, para inervar áreas corticales contiguas. Este tipo de distribución tangencial, en algunos casos muy similar a la que hemos visto para algunas poblaciones neuronales del dLGN, se ha sugerido que puede permitir la comunicación transcortical indirecta a través del complejo LP, replicando de esta forma el mismo circuito, pero esta vez con una función más bien reguladora y coordinadora del procesamiento de la información que se va a llevar a cabo en circuitos cortico-corticales (Reichova y Sherman 2004; Shipp 2004; Sherman y Guillery 2011; Viaene et al. 2011a, 2011b; Bridge et al. 2016).

5 SISTEMA DE PROYECCIÓN DEL NÚCLEO LPMC

5.1 Dianas corticales

Para cada uno de los núcleos que componen el tálamo visual, la primera pregunta que nos hacemos es si en la organización de su sistema de proyección TC el núcleo en cuestión va a mantener los mapas retinotópicos y mono-/binocular de una forma más o menos conservada. El caso del LPMC, núcleo del complejo LP de menor volumen, es muy particular a en este respecto. A pesar de que su principal proyección aferente *driver* (como indica el denso inmunomarcado hallado con vGluT2, Baldwin et al. 2011) procede de forma ipsi- y contralateral de las capas superficiales del SC (SGS y SO), donde existe un mapa retinotópico y ocular completo, esta proyección al LPMC (Mason y Groos 1981; Bickford et al. 2015; Zhou et al. 2017) como se ha descrito, muestra una topografía difusa. En otros roedores, se ha estudiado cómo la proyección ipsilateral desde las capas superficiales mantiene cierta topografía, mientras que la aferencia del SC contralateral sin aparente retinotopía, poseería una función visual no discriminativa *per se*, sino relacionada con la percepción de estímulos en movimiento, el control de acciones guiadas visualmente e iniciación de movimientos de la mirada en relación al estímulo visual (Crain y Hall 1980; Mooney, Nikolettseas, Ruiz, et al. 1988; Lane et al. 1993; Merabet et al. 1998; Sparks et al. 2000; Shi y Davis 2001; Lomber 2002; Kaas y Lyon 2008; Zhou et al. 2017). Su otra aferencia mayoritaria desde capas 5 y 6 de V1 (que mantiene en algunos casos una retinotopía difusa), junto a la capa 6 de áreas visuales asociativas laterales, temporales

y parahipocampales (Mason y Groos 1981; Schober 1981; Bourassa y Deschênes 1995; Li et al. 2003), lo que tampoco contribuye en exceso al mantenimiento de estos mapas oculares y retinotópicos en el LPMC.

A través de nuestros experimentos de marcado retrógrado, es muy difícil distinguir una organización retinotópica en el LPMC, también debido al ínfimo volumen que ocupa en relación al resto de núcleos del LP, lo que influye, de igual forma, en el bajo número de depósitos de trazador anterógrado válidos en este núcleo. Sí hemos observado, sin embargo, que las poblaciones neuronales del LPMC conducen información preferentemente hacia el campo visual temporal representado en V1 (Figura 72), siguiendo una distribución de invertida (regiones laterales del LPMC proyectan a V1 medial y viceversa, observar depósitos rosa y verde).

La proyección de LPMC está fundamentalmente direccionada hacia regiones corticales laterales (Figuras 75 y 97), como comprobamos con el marcado retrógrado desde áreas visuales asociativas laterales, innervando las regiones corticales mencionadas anteriormente como aferentes corticales al núcleo de forma bidireccional pero con un característico patrón en su distribución laminar. En el Anexo 3, observamos que la mayor parte de los depósitos estudiados en el LPMC, poseen una pequeña contaminación de los núcleos circundantes (dLGN, LPL, LPMR). Pero en los cuatro casos observamos que el patrón laminar preferente en V1 es dirigido a las capas 1 y 5, como vimos para el LPL, mientras que en áreas visuales extraestriadas (LM, LI, P, AL, RL, V2Locc y POR) predominan las capas superficiales (1) e intermedias (3-4) como las que reciben mayor innervación cualitativamente, aunque en algunos casos pueden extenderse a la capa 5. Por último, las áreas corticales no visuales diana de los axones del LPMC, son áreas temporales (TeA) donde se observa una distribución de los terminales axónicos arborizando en capas 1 y 5, mientras que en áreas parahipocampales (Ect, PRh) se mantiene un patrón preferente hacia las láminas corticales 1 e intermedias (3-4) (Chomsung et al. 2010; Zhou et al. 2017). En general, los patrones de distribución tangencial y laminar que hemos observado se corresponden con los previamente publicados (Hughes 1977; Olavarria 1979; Coleman y Clerici 1980; Perry 1980; Schober 1981; Mason y Groos 1981; Sumitomo et al. 1988; Dreher et al. 1990; Sanderson et al. 1991; McDonald y Mascagni 1996; Shi y Davis 2001; Furtak, Wei, et al. 2007; Nakamura et al. 2015; Zhou et al. 2017). Sería muy interesante realizar una cuantificación de la cantidad de axón o número de varicosidades que dejan estas poblaciones neuronales en cada capa cortical, pero debido a la heterogeneidad en el tamaño de las inyecciones, estos datos no serían muy relevantes. El único caso en el que toma protagonismo la cuantificación de estos parámetros en las distintas áreas innervadas es en el caso del marcado de neuronas únicas, como lo estamos empezando a realizar en las últimas neuronas reconstruidas tridimensionalmente,

donde una actualización del software Neurolúcida, nos permite calcular estos parámetros por lámina cortical (Figura 96). Desafortunadamente, no contamos con neuronas aisladas reconstruidas en su totalidad en el núcleo LPMC, por lo que al no haber podido incluir ninguna en el trabajo, no es posible determinar si este tipo de distribución tangencial del LPMC se debe a poblaciones neuronales independientes o a la aparición de múltiples colaterales axónicas. En la literatura, aparecen únicamente estudios de doble marcado retrógrado desde áreas corticales temporales, regiones subcorticales (como el Str y la LA) y centros origen de aferencias como el SC, en los que identifican células doblemente marcadas en el LPMC (Takada 1992; Doron y Ledoux 2000; Wei et al. 2015).

5.2 Dianas subcorticales

Las proyecciones subcorticales del LPMC al Str dorsolateral caudal y a LA han sido previamente documentadas en varios trabajos, muchos de los cuales hemos comentado en el apartado anterior. Desde el punto de vista funcional, el circuito originado en las capas superficiales del SC, pasando por el LPMC como punto regulador de las aferencias coliculares, y continuando hasta terminar simultáneamente en regiones subcorticales (Str y LA) y corticales visuales, temporales y parahipocampales, ha sido frecuentemente estudiado en todo su conjunto. Además, todos estos centros corticales y subcorticales están muy conectados entre sí, que favorecen su papel en el abanico de comportamientos con los que se le ha relacionado (Coleman y Clerici 1980; Mason y Gross 1981; Shi y Davis 2001). Se le ha asociado especialmente, con la vía encargada del miedo condicionado a estímulos amenazantes o aversivos auditivos o visuales inconscientes, así como funciones motoras y en el procesamiento, aprendizaje y memoria visuoespacial (Doron y Ledoux 1999; Shi y Davis 2001; Liddell et al. 2005; Agster y Burwell 2009; Day-Brown et al. 2010a; Wei et al. 2015; Bergman et al. 2016). Con nuestro estudio de marcado anterógrado poblacional en LPMC, podemos aportar la localización exacta de los principales lugares de arborización terminal en el Str (en su polo lateral) y en la LA, donde principalmente terminan en la región dorsal limitante con el Str, así como en la región de transición estriato-amigdalina donde también observamos axones varicosos. Estos lugares de terminación de la proyección amigdalina no aparecen reportados en detalle en la literatura.

6 SISTEMA DE PROYECCIÓN DEL NÚCLEO LPMR

6.1 Dianas corticales

El núcleo LPMR es el núcleo del tálamo visual del ratón que presenta una mayor diversidad en su red de conexiones. Nuestros depósitos de trazadores retrógrados en V1, no nos aportan ningún indicio de la posible existencia de una topografía específica en este núcleo y de la distinción de un segmento mono- o binocular en su interior. Esto puede ser consecuencia del tipo y la organización de las proyecciones aferentes que recibe. Mediante el inmunomarcado con vGluT2, que realizamos con la finalidad de delimitar los núcleos del complejo LP, observamos que a diferencia de los otros dos núcleos, el LPMR no presenta gruesos axones varicosos como en el dLGN o en el LPMC, ni siquiera pequeñas pero abundantes varicosidades axónicas como el LPL, más bien aparecen pequeñas varicosidades no muy abundantes. Esto puede ser producto de que el LPMR apenas recibe proyecciones retinianas (Morin y Studholme 2014), de las que se desconocen si proceden mayoritariamente de algún cuadrante del campo visual, ni del SC, que inervan principalmente a la región caudal del complejo LP. Por lo que su principal aferente *driver* procede casi exclusivamente de la capa 5 de diversas áreas corticales, entre las que se ha cuenta V1, a las que proyecta recíprocamente el LPMR, así que se podría clasificar claramente como un núcleo HO (Abramson y Chalupa 1985; Bourassa y Deschênes 1995; Guillery et al. 2001; Shipp 2003; Sherman y Guillery 2011). También va a recibir, por supuesto, proyecciones *modulatory* desde la capa 6 de múltiples áreas corticales. Una de las razones por las que se le ha otorgado al LPMR un papel como un centro integrador y en el procesamiento multisensorial, es porque se ha descrito una aferencia a regiones ventrales del LPMR de carácter somatosensorial nociceptivo (Nosedá et al. 2010b; Allen et al. 2016). Por otro lado, los experimentos de trazado retrógrado desde áreas visuales asociativas dispuestas lateral y medialmente a V1 (Figuras 75 y 76), continúan transmitiendo la idea de una organización de las mismas en el LPMR. De forma que las proyecciones hacia áreas laterales, se originan en regiones caudales del LPMR y viceversa.

Para el estudio en conjunto de todo el sistema de proyección eferente TC y hacia centros subcorticales del LPMR, nos basamos en el trazado anterógrado de estas vías, tomando especial relevancia para el caso del LPMR el marcado con el vector AAV-GFP que nos permite asegurar el relleno completo de la neurona infectada, lo que es de gran valor para sistemas TC “inespecíficos” que poseen gran cantidad de dianas corticales muy diversas y distantes entre sí. El núcleo LPMR presenta tal complejidad en su sistema de proyección eferente que, en base a sus dianas corticales, podemos distinguir tres sectores hodológicos dispuestos en su eje latero-

medial: lateral, central y medial. El núcleo LPMR en roedores es, con diferencia, el núcleo del complejo LP menos estudiado en la literatura por lo que apenas aparecen trabajos donde se hayan diferenciado claramente regiones en función de su conectividad.

Las proyecciones corticales originadas en la porción lateral del LPMR, limitando con LPL, se caracterizan por inervar principalmente áreas visuales, primaria y asociativas, y parietales posteriores, siguiendo en algunos casos un patrón de distribución tangencial y laminar de los terminales similar al observado en el LPL, probablemente porque se trate de una zona de transición. Pero a diferencia del LPL, sus terminales axónicos van a alcanzar áreas temporales (TeA) innervando principalmente la lámina 1, áreas parahipocampales polimodales (Ect, PRh) con un patrón laminar de capas 1 e intermedias (3-4), corteza retroesplenial disgranular (RSD) y extendiéndose a través de la capa 1 a la retroesplenial granular (RSG), así como alcanzando el área motora secundaria (M2) innervando también, en este caso, la capa cortical 1; coincidiendo con las proyecciones descritas por Tohmi et al. (2014), Nakamura et al. (2015) y Roth et al. (2016). Estas últimas dos áreas no habían aparecido entre las dianas corticales del LPL, pero trabajos previos describen las conexiones del LPMR con áreas parietales posteriores, motoras y retroesplénicas (Hughes 1977; Kamishina et al. 2009).

Los depósitos de trazadores anterógrados en la porción central del núcleo, muestran una frontalización en la extensión de las proyecciones corticales. Mantienen las dianas descritas en el párrafo anterior, añadiendo áreas cingulares (Cg), área frontal asociativa (FrA) y prefrontal (PrL), en los tres casos alcanzando únicamente la lámina cortical 1 de forma escasa. Las proyecciones de algunas de estas áreas se habían descrito mediante trazado retrógrado a regiones mediales del LPMR (Hicks y Huerta 1991; Condé et al. 1995; Conte et al. 2008; Kamishina et al. 2009; Nakamura et al. 2015), pudiendo participar, a través de estas conexiones con la corteza cingular, en mecanismos de dirección de la atención y de la negligencia contralateral en caso de su lesión (Hicks y Huerta 1991; Reep y Corwin 1999, 2009). La trayectoria de los axones para alcanzar estas áreas corticales tan distantes parece ser a través de la lámina cortical 6, pero sólo mediante el marcado de neuronas individuales podemos afirmar de forma inequívoca esta cuestión.

Por último, en la porción más medial del LPMR, limitante con los núcleos talámicos CL y MD, continuamos observando esta progresión de los axones TC hacia áreas más rostrales. Las neuronas del LPMR medial van a innervar las dianas corticales que habíamos mencionado para los otros dos sectores del LPMR, siguiendo una distribución laminar similar, con la excepción de las tres áreas parietales posteriores (MPtA, LPtA y PPtA), regiones caudales de M2 y Cg donde

los axones arborizan en las capas 1 y 5 (descrito en Cg mediante trazado anterógrado en ratas por Vertes 2002), y en RSD y TeA donde los terminales varicosos aparecen en capa 1 y capas intermedias (Chandler et al. 1992; Reep et al. 1994; Kamishina et al. 2009).

Entre las áreas corticales más alejadas que alcanzan las proyecciones del LPRM medial, están diversas áreas orbitarias (LO, MO, VO) donde inervan preferentemente la capa 1, y de forma muy escasa capas intermedias, y el área insular ventral donde también inerva la capa 1. Las proyecciones hacia regiones ventrales de la corteza insular se han estudiado en mayor medida en primates, mediante técnicas anatómicas y electrofisiológicas, donde se les ha atribuido una función integradora de múltiples modalidades sensoriales, así como una relación con el comportamiento social de acercamiento hacia conespecíficos (Mufson y Mesulam 1984, Jezzini et al. 2015). Debido a la menor sensibilidad y resolución de las técnicas de trazado utilizadas en otros estudios descriptivos de las proyecciones TC del LPMR, la mayor parte de estas áreas más alejadas, del lóbulo frontal y temporal, no habían sido mencionadas antes, a excepción del trabajo de Nakamura et al. (2015) de reconstrucción completa de neuronas aisladas marcadas también con vectores virales. La utilización de vectores virales en nuestro caso, es lo que nos ha permitido observar estas proyecciones, en la mayor parte de los casos, restringidas a la parte superior de la capa 1, y presentando axones de muy bajo calibre que dificultan en muchos casos su reconocimiento. También nos ha permitido comprobar las múltiples colaterales axónicas que manda una misma neurona marcada del LPMR inervando hasta 7 áreas corticales y dos subcorticales (Figura 96). Tras el análisis de nuestros datos, observamos que esta región medial del LPMR posee gran similitud en sus dianas corticales con otros trabajos anatómicos realizados tomando como modelo de estudio el pulvinar medial de primates (Córdoba-Claros 2017), por lo que podemos afirmar que, de forma semejante, el LPMR va a mantener conexiones con áreas corticales unimodales (visuales, motoras, límbicas), multimodales y asociativas (Dick et al. 1991; Stepniewska 2003; Kaas y Lyon 2007). De esta forma el LPMR podría estar actuando como núcleo coordinador de la activación/inactivación de determinadas áreas, o regulando el tipo de información que está recibiendo específicamente cada área cortical que interconecta, permitiendo así una comunicación transcortical indirecta, como hemos mencionado previamente (Shipp 2003; Bridge 2016).

6.2 Dianas subcorticales

Entre los experimentos anterógrados en el LPMR, localizados siempre en la porción caudal del núcleo, con una alta incidencia, observamos arborizaciones en el Str que se extienden en

mayor medida en el eje medio-lateral que las neuronas del LPL o el LPMC, coincidiendo con las descripciones de Funaki et al. (1998). Estas arborizaciones siempre se encuentran restringidas a la porción dorsal del Str, que coincide con la región receptora de terminales desde las cortezas M2, Cg, parietal posterior, parahipocampal, orbitarias y visuales (estriada y extraestriadas) entre otras, actuando aparentemente como nexo en la red asociativa multimodal cortical y de dirección de la atención (Serizawa et al. 1994; Cheatwood et al. 2003), y también directamente modulando comportamientos motores orientados hacia un estímulo visual procesado de forma inconsciente.

Esta última función de estas proyecciones tálamo-estriatales que se ha sugerido por otros autores, guarda una gran relación con la proyección que hemos observado desde el LPMR, también caudal, al núcleo lateral de la amígdala (LA) en sus niveles más anteriores. Ya que a nivel funcional, se ha relacionado esta proyección desde LPMC y, en menor medida, desde LPMR de forma simultánea hacia el Str y la LA (como hemos comprobado con el marcado de neuronas aisladas del LPMR (Figura 96)) con movimientos rápidos orientados para protegerse ante estímulos visuales aversivos o amenazantes de forma en animales con visión lateralizada (Takada 1992; Doron y LeDoux 1999; Day-Brown et al 2010).

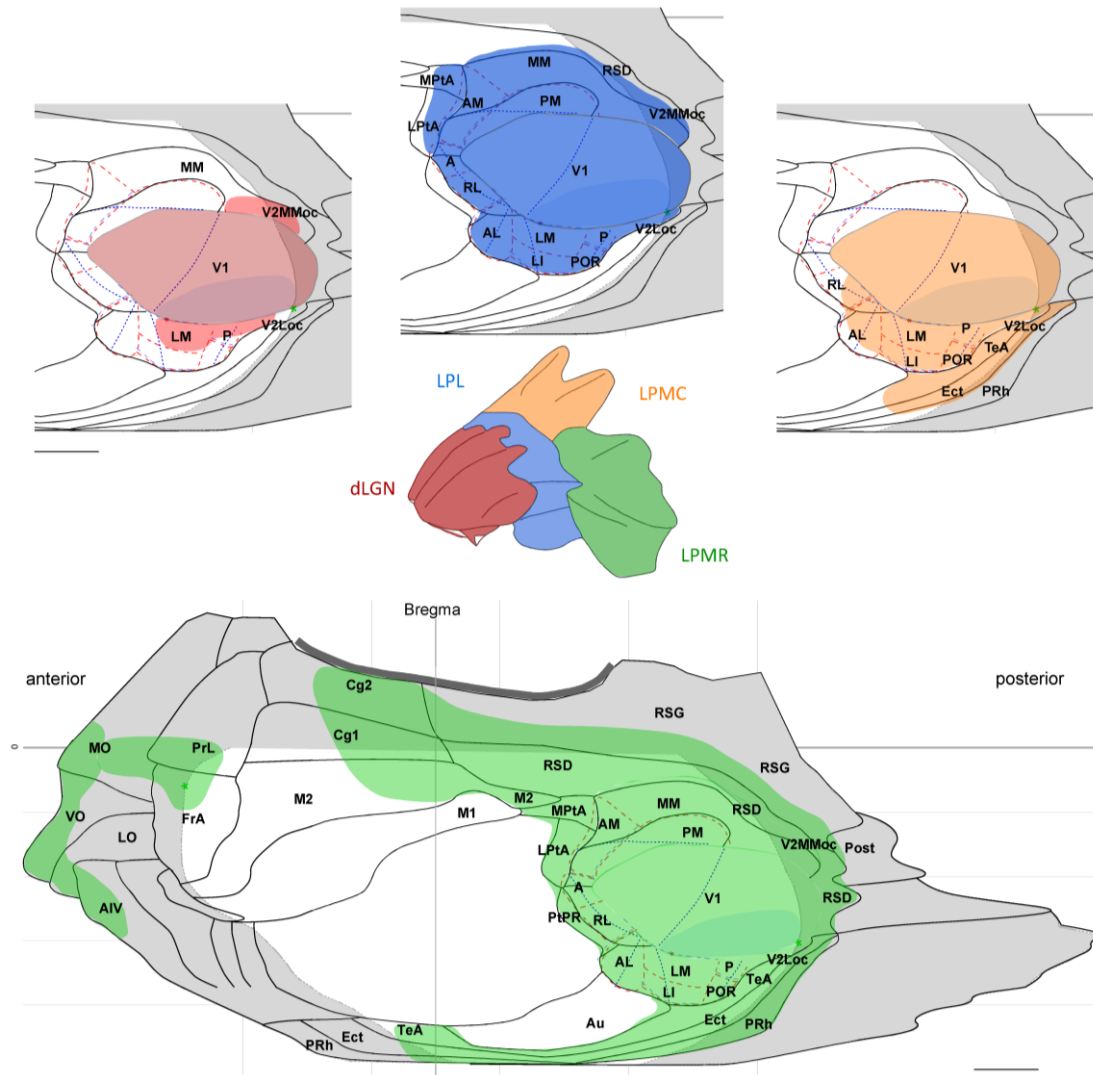


Figura 97. Resumen de los patrones comunes de distribución tangencial de las proyecciones TC originadas en los núcleos talámicos visuales dLGN (rojo), LPL (azul), LPMC (naranja) y LPMR (verde). En el centro de la figura se muestra modelo tridimensional de estos cuatro núcleos, mientras que sus proyecciones corticales se han representado sobre el mapa plano de la superficie cortical siguiendo el código de colores. En cada caso se han indicado el nombre de las áreas visuales donde se han encontrado terminales axónicos TC originados en cada uno de estos núcleos. Ver lista de abreviaturas. Barras de calibración de 1mm.

7 ANÁLISIS DEL TAMAÑO DE LAS VARICOSIDADES AXÓNICAS CORTICALES DE LAS PROYECCIONES DE LOS DISTINTOS NÚCLEOS DEL TÁLAMO VISUAL

Como hemos comentado anteriormente en la Discusión, el análisis cuantitativo en términos absolutos de longitud de axón y número de varicosidades por capa cortical con el fin de comparar las características morfofuncionales de cada arborización cortical encontrada, carece de valor si desconocemos el número total de neuronas marcadas en el depósito de trazador

anterógrado. En este estudio llevamos a cabo una aproximación cuantitativa midiendo el tamaño relativo del área de proyección máxima de las varicosidades halladas en las principales áreas y láminas corticales diana de los axones procedentes del dLGN y el complejo LP. Se han llevado a cabo múltiples estudios con el fin de hallar una correlación morfo-funcional entre el tamaño de las varicosidades axónicas y la existencia y eficacia (como el tamaño del EPSP que genera) de la posible sinapsis que se esté produciendo (White et al. 2004; Viaene et al. 2011a, 2011c, 2011d; Petrof y Sherman 2013). Así, se observó mediante microscopía electrónica que el 87% de las sinapsis en capa 4 de S1 del ratón se producen en las varicosidades axónicas, y en un 67% sólo aparece una sinapsis por botón (White et al. 2004), aunque en muchos casos se han detectado varicosidades que no forman sinapsis (da Costa y Martin 2011). En muchos de estos trabajos, clasifican las varicosidades procedentes de axones glutamatérgicos en grandes ($>1\mu\text{m}^2$ de área de sección transversa) o originadas por vías de clase 1, y pequeñas ($<1\mu\text{m}^2$) o de clase 2. Las vías de clase 1 muestran axones gruesos como las vías de tipo *driver* retino-geniculada, tecto-pulvinar (como hemos observado con el inmunomarcado con vGluT2) o cortico-talámica originada por neuronas de capa 5, y al tipo de varicosidades que producen (Li et al. 2003; Reichova y Sherman 2004; Hammer et al. 2014; Ichida et al. 2014; Familtsev et al. 2016), las cuales electrofisiológicamente se caracterizan por mostrar grandes EPSPs y depresión por pares de pulsos. Por otro lado, las varicosidades tipo 2 se asocian con vías glutamatérgicas *modulatory* que presentan axones de menor calibre en sus dianas de proyección, y que electrofisiológicamente muestran pequeños EPSPs y facilitación por pares de pulsos (Figura 5). Este tipo de varicosidades se han descrito en proyecciones cortico-talámicas originadas en capa 6 (Li et al. 2003; Lee y Sherman 2009).

En cuanto a las proyecciones TC, se ha estudiado el sistema somatosensorial y auditivo del ratón y la rata (Smith et al. 2012), y en el sistema visual de primates en mayor medida, mostrando que las proyecciones marcadas con el trazador BDA, como en nuestro caso, alcanzando la capa 5 de S1 originadas en el núcleo talámico posterior son, en base a sus características anatómicas ($<0,5\mu\text{m}^2$), de clase 2 (Viaene et al. 2011d); mientras que las varicosidades que forman los axones de este mismo núcleo en capas intermedias (3-4) de las áreas S2 y M1 se podrían clasificar por su tamaño ($<1,5\mu\text{m}^2$) como tipo 1 o *driver* (Viaene et al. 2011d; Porrero 2016).

En nuestro caso, realizamos las mediciones de área de proyección máxima de las varicosidades bajo microscopía óptica basándonos en que las diferencias con respecto a las mediciones con microscopía electrónica son razonablemente similares (Smith et al. 2012; Rodríguez-Moreno et al. 2017). Y en relación a la selección de áreas corticales y capas de estudio,

escogimos en base a los trabajos mencionados del grupo de Sherman en el sistema somatosensorial, un núcleo modelo FO, el dLGN, cuyas principales proyecciones son, como hemos visto, a la capa 3-4 de V1 y capa 1 de áreas visuales asociativas (en este caso tomamos como espacio muestral a LM); y un núcleo modelo HO, el LPMR, donde muestreamos en capa 5 de V1 y capa 3-4 del área LM. Los únicos trabajos previos de microscopía óptica en relación al sistema visual, en este caso de primates (Marion et al. 2013), comparan el tamaño de las varicosidades formadas por axones del dLGN en capas 3-4 de V1 con las varicosidades procedentes de neuronas del núcleo pulvinar lateral que van a inervar las capas 3-4 de V2. En ambos casos, a pesar que obtiene tamaños similares ($0,70\text{-}0,52\mu\text{m}^2$ en V1 y $0,44\mu\text{m}^2$ en V2), son mucho más inferiores a los encontrados en el sistema somatosensorial del ratón (Viaene et al. 2011d), por lo que no los consideraremos para establecer comparaciones. Nuestros datos de tamaño medio relativo de varicosidades axónicas procedentes de depósitos de BDA en el dLGN son en capas intermedias (3-4) de V1 de $1,35\mu\text{m}^2$, mientras que en capa 1 de LM de $0,62\mu\text{m}^2$; con lo que siguiendo la clasificación del grupo de Sherman (Petrof y Sherman 2013), podríamos catalogar las varicosidades de V1 como tipo 1 o *driver*, y las del LM como tipo 2 o *modulatory*. En cuanto a las medidas realizadas en las varicosidades formadas por poblaciones neuronales en LPMR, en capa 5 de V1 obtenemos $0,71\mu\text{m}^2$ (correspondiente con clase 1) mientras que en capas 3-4 de LM de $1,18\mu\text{m}^2$ (clase 2). Estos datos en capas intermedias de V1 desde dLGN y capas intermedias de LM desde LPMR presentan gran similitud con los obtenidos en otro trabajo en capas intermedias de S1 desde el núcleo ventral posterior y de capas intermedias de S2 y M1 desde el núcleo posterior en ratón (Porrero 2016). Con los resultados que hemos obtenido podemos afirmar que la proyección *driver* del dLGN se encuentra dirigida a capas intermedias de V1, mientras que su inervación en capa 1 de LM es de carácter modulador. En el caso de uno de los núcleos del complejo LP, este sistema de proyección TC cambia radicalmente, constituyendo en este caso su eferencia *driver* las capas intermedias de LM y *modulatory* la capa 5 de V1.

VI CONCLUSIONES

1. El núcleo dLGN y los tres núcleos que conforman el complejo LP (LPL, LPMC, LPMR) del tálamo de ratón pueden delinearse de manera consistente mediante la combinación de criterios citoarquitectónicos y de la inmunotinción para proteínas como vGluT2, CR, AchE y CB.
2. Las neuronas de proyección del núcleo dLGN inervan un único punto de la corteza visual primaria. Estos axones arborizan profusamente en las capas 3-4 y en menor medida en las capas 1 y 6. Cuando inervan regiones V1, limitantes con áreas visuales asociativas, las arborizaciones pueden extenderse por cortas distancias en la capa 1 de dichas áreas.
3. La comparación de los dominios de V1 inervados desde cada punto del dLGN con los mapas retinotópicos publicados por otros, indica que estos axones talamocorticales mantienen una organización retinotópica. Por ejemplo, las poblaciones neuronales localizadas en el extremo lateral del dLGN inervan el borde medial de V1 que representa el campo periférico temporal, mientras que las neuronas localizadas en el borde medial de dLGN inervan el borde lateral de V1, que representa el azimuth 0. Las neuronas situadas en la porción lateroventral de dLGN inervan el extremo anterior de V1 que representa el campo nasal/inferior. Las neuronas localizadas rostral y medialmente en dLGN inervan regiones de V1 situadas ventralmente al polo occipital, que representan el campo visual temporal/superior.
4. Las neuronas contenidas en el núcleo LPL inervan de modo divergente a entre 3 y 9 áreas corticales, generalmente visuales, tanto V1 como áreas asociativas. También puede inervar la corteza parietal posterior asociativa, áreas temporales asociativas y corteza retrosplenial. El marcado retrógrado indica cierta segregación de las proyecciones en el eje rostro-caudal. Las neuronas localizadas en la porción caudal del LPL inervan en mayor medida áreas visuales asociativas laterales (LM, LI, P, POR); las neuronas de la región central del LPL proyectan a áreas visuales asociativas rostrales (AL, RL); y las neuronas de la porción rostral del LPL inervan áreas visuales asociativas mediales (PM, V2MMoc).
5. Las neuronas del núcleo LPMC inervan entre 6 y 10 áreas corticales, generalmente muy próximas entre sí. Entre dichas áreas se encuentran en todos los casos las áreas visuales asociativas laterales como LM, P o V2Loc, junto con áreas temporales y parahipocampales como TeA, Ect o PRh. En menor medida también inervan otras áreas visuales asociativas o la corteza parietal posterior asociativa.

6. Las neuronas del núcleo LPMR inervan la mayor parte del hemisferio cerebral, con la notable excepción de las áreas primarias auditiva y somatosensorial. Sus arborizaciones terminales se concentran en la capa 1. Las principales dianas son áreas visuales asociativas, temporales y parahipocampales, parietal posterior asociativa, retroesplenial, motora secundaria, cingular, frontal asociativa y prelímbica. En menor medida, inervan también las áreas orbitaria, insular y entorrinal.
7. Los experimentos de marcado completo mediante trasfección de neuronas aisladas revelan un patrón de arborización axónico congruente con el marcaje observado en los experimentos de marcado poblacional. Todas las neuronas inervan mediante colaterales el núcleo reticular del tálamo. Las neuronas del dLGN arborizan en único foco, con un diámetro de dispersión de $\sim 500\mu\text{m}$. Las neuronas del LPL forman una a dos arborizaciones, una siempre en un área visual asociativa y a veces también en V1. Los dominios inervados tienen un diámetro de $\sim 500\mu\text{m}$.
8. Los axones de los núcleos LPL, LPMC y LPMR que alcanzan V1 inervan predominantemente las capas 1 y 5. En el resto de áreas el patrón laminar es variable, predominantemente 1 y 3-4-5.
9. Las neuronas del dLGN no inervan el estriado. En cambio, las neuronas del complejo LP inervan a distintas regiones del estriado dorsal, principalmente dorsales y dorsolaterales en el caso del LPL y LPMR, y caudales en el caso del LPMC, mediante ramas colaterales.
10. Las neuronas de LPMC inervan también al núcleo lateral de la amígdala, que a la vez inervan cortezas temporales y parahipocampales.

VII BIBLIOGRAFÍA

- Abivardi A, Bach DR. 2017. Deconstructing white matter connectivity of human amygdala nuclei with thalamus and cortex subdivisions in vivo. *Hum Brain Mapp.* 38:3927-3940.
- Abramson BP, Chalupa LM. 1985. The laminar distribution of cortical connections with the tecto- and cortico-recipient zones in the cat's lateral posterior nucleus. *Neuroscience.* 15:81-95.
- Abramson BP, Chalupa LM. 1988. Multiple pathways from the superior colliculus to the extrageniculate visual thalamus of the cat. *J Comp Neurol.* 271:397-418.
- Acuña C, Cudeiro J, Gonzalez F, Alonso JM, Perez R. 1990. Lateral-posterior and pulvinar reaching cells--comparison with parietal area 5a: a study in behaving *Macaca nemestrina* monkeys. *Exp brain Res.* 82:158-166.
- Agarwala S, Kalil RE. 1998. Axotomy-induced neuronal death and reactive astrogliosis in the lateral geniculate nucleus following a lesion of the visual cortex in the rat. *J Comp Neurol.* 392:252-263.
- Agster KL, Burwell RD. 2009. Cortical efferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *Hippocampus.* 19:1159-1186.
- Ahmad A, Spear PD. 1993. Effects of aging on the size, density, and number of rhesus monkey lateral geniculate neurons. *J Comp Neurol.* 334:631-643.
- Ahmadlou M, Heimel JA. 2015. Preference for concentric orientations in the mouse superior colliculus. *Nat Commun.* 6:6773.
- Ahmed AI, Rahi AH. 1985. Physiological and pathobiological significance of ocular glycoproteins. I. Studies using fluorescein labelled glycine max. *Br J Ophthalmol.* 69:162-170.
- Alexander I, Cowey A. 2010. Edges, colour and awareness in blindsight. *Conscious Cogn.* 19:520-533.
- Allen AE, Procyk CA, Howarth M, Walmsley L, Brown TM. 2016. Visual input to the mouse lateral posterior and posterior thalamic nuclei: photoreceptive origins and retinotopic order. *J Physiol.* 594:1911-1929.
- Altman J, Bayer SA. 1989. Development of the rat thalamus.4 The intermediate lobule of the thalamic neuroepithelium, and the time and site of origin and settling pattern of neurons of the ventral nuclear complex. 284:534-566.
- Andermann ML, Kerlin AM, Roumis DK, Glickfeld LL, Reid RC. 2011. Functional Specialization of Mouse Higher Visual Cortical Areas. *Neuron.* 72:1025-1039.
- Andersen BB, Gundersen HJ. 1999. Pronounced loss of cell nuclei and anisotropic deformation of thick sections. *J Microsc.* 196:69-73.
- Angelucci A, Clascá F, Sur M. 1996. Anterograde axonal tracing with the subunit B of cholera toxin: a highly sensitive immunohistochemical protocol for revealing fine axonal morphology in adult and neonatal brains. *J Neurosci Methods.* 65:101-112.
- Antonini a, Fagiolini M, Stryker MP. 1999. Anatomical correlates of functional plasticity in mouse visual cortex. *J Neurosci.* 19:4388-4406.
- Applebury ML, Antoch MP, Baxter LC, Chun LL, Falk JD, Farhangfar F, Kage K, Krzystolik MG, Lyass LA, Robbins JT. 2000. The murine cone photoreceptor: a single cone type expresses both S and M opsins with retinal spatial patterning. *Neuron.* 27:513-523.
- Arai R, Jacobowitz DM, Deura S. 1994. Distribution of calretinin, calbindin-D28k, and parvalbumin in the rat thalamus. *Brain Res Bull.* 33:595-614.

- Arbuthnott GW, MacLeod NK, Maxwell DJ, Wright AK. 1990. Distribution and synaptic contacts of the cortical terminals arising from neurons in the rat ventromedial thalamic nucleus. *Neuroscience*. 38:47-60.
- Arcaro MJ, Pinsk MA, Kastner S. 2015. The Anatomical and Functional Organization of the Human Visual Pulvinar. *J Neurosci*. 35:9848-9871.
- Arcelli P, Frasconi C, Regondi MC, Biasi S De, Spreafico R. 1996. GABAergic neurons in mammalian thalamus: A marker of thalamic complexity? *Brain Res Bull*. 42:27-37.
- Arend I, Machado L, Ward R, McGrath M, Ro T, Rafal RD. 2008. The role of the human pulvinar in visual attention and action: evidence from temporal-order judgment, saccade decision, and antisaccade tasks. *Prog Brain Res*. 171:475-483.
- ATCHISON RW, CASTO BC, HAMMON WM. 1965. ADENOVIRUS-ASSOCIATED DEFECTIVE VIRUS PARTICLES. *Science*. 149:754-756.
- Avendaño C, Stepniewska I, Rausell E, Reinoso-Suárez F. 1990. Segregation and heterogeneity of thalamic cell populations projecting to superficial layers of posterior parietal cortex: a retrograde tracer study in cat and monkey. *Neuroscience*. 39:547-559.
- Badea TC, Nathans J. 2004. Quantitative analysis of neuronal morphologies in the mouse retina visualized by using a genetically directed reporter. *J Comp Neurol*. 480:331-351.
- Baden T, Berens P, Franke K, Román Rosón M, Bethge M, Euler T. 2016. The functional diversity of retinal ganglion cells in the mouse. *Nature*. 529:345-350.
- Baden T, Schubert T, Chang L, Wei T, Zaichuk M, Wissinger B, Euler T. 2013. A Tale of Two Retinal Domains: Near-Optimal Sampling of Achromatic Contrasts in Natural Scenes through Asymmetric Photoreceptor Distribution. *Neuron*. 80:1206-1217.
- Balaram P, Isaamullah M, Petry HM, Bickford ME, Kaas JH. 2015. Distributions of vesicular glutamate transporters 1 and 2 in the visual system of tree shrews (*Tupaia belangeri*). *J Comp Neurol*. 523:1792-1808.
- Baldauf ZB, Chomsung RD, Garden WB, May PJ, Bickford ME. 2005. Ultrastructural analysis of projections to the pulvinar nucleus of the cat. I: Middle suprasylvian gyrus (areas 5 and 7). *J Comp Neurol*. 485:87-107.
- Baldwin MKL, Balaram P, Kaas JH. 2013. Projections of the superior colliculus to the pulvinar in prosimian galagos (*Otolemur garnettii*) and VGLUT2 staining of the visual pulvinar. *J Comp Neurol*. 521:1664-1682.
- Baldwin MKL, Balaram P, Kaas JH. 2017. The evolution and functions of nuclei of the visual pulvinar in primates. *J Comp Neurol*. 525:3207-3226.
- Baldwin MKL, Wong P, Reed JL, Kaas JH. 2011. Superior colliculus connections with visual thalamus in gray squirrels (*Sciurus carolinensis*): Evidence for four subdivisions within the pulvinar complex. *J Comp Neurol*. 519:1071-1094.
- Barrenechea C, Pedemonte M, Nuñez A, García-Austt E. 1995. In vivo intracellular recordings of medial septal and diagonal band of Broca neurons: relationships with theta rhythm. *Exp brain Res*. 103:31-40.
- Baryshnikova LM, Von Bohlen Und Halbach O, Kaplan S, Von Bartheld CS. 2006. Two distinct events, section compression and loss of particles («lost caps»), contribute to z-axis distortion and bias in optical disector counting. *Microsc Res Tech*. 69:738-756.

- Beckstead RM. 1979. An autoradiographic examination of corticocortical and subcortical projections of the mediodorsal-projection (prefrontal) cortex in the rat. *J Comp Neurol.* 184:43-62.
- Bender DB. 1981. Retinotopic organization of macaque pulvinar. *J Neurophysiol.* 46:672-693.
- Benevento LA, Miller J. 1981. Visual responses of single neurons in the caudal lateral pulvinar of the macaque monkey. *J Neurosci.* 1:1268-1278.
- Bentivoglio M, Kuypers HG, Catsman-Berrevoets CE, Loewe H, Dann O. 1980. Two new fluorescent retrograde neuronal tracers which are transported over long distances. *Neurosci Lett.* 18:25-30.
- Bentivoglio M, Spreafico R, Minciacchi D, Macchi G. 1991. GABAergic interneurons and neuropil of the intralaminar thalamus: an immunohistochemical study in the rat and the cat, with notes in the monkey. *Exp brain Res.* 87:85-95.
- Berendse HW, Groenewegen HJ. 1991. Restricted cortical termination fields of the midline and intralaminar thalamic nuclei in the rat. *Neuroscience.* 42:73-102.
- Bergman P, Västfjäll D, Tajadura-Jiménez A, Asutay E. 2016. Auditory-Induced Emotion Mediates Perceptual Categorization of Everyday Sounds. *Front Psychol.* 7:1565.
- Berman NEJ, Raymond LA, Warren KA, Raghavan R, Joag S V., Narayan O, Cheney PD. 1998. Fractionator analysis shows loss of neurons in the lateral geniculate nucleus of macaques infected with neurovirulent simian immunodeficiency virus. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 24:44-52.
- Bermejo PE, Jiménez CE, Torres C V, Avendaño C. 2003. Quantitative stereological evaluation of the gracile and cuneate nuclei and their projection neurons in the rat. *J Comp Neurol.* 463:419-433.
- Berson DM, Dunn FA, Takao M. 2002. Phototransduction by Retinal Ganglion Cells That Set the Circadian Clock. *Science (80-).* 295:1070-1073.
- Berson EL. 2008. Retinal Degenerations: Planning for the Future. p. 21-35.
- Bickford ME. 2015. Thalamic Circuit Diversity: Modulation of the Driver/Modulator Framework. *Front Neural Circuits.* 9:86.
- Bickford ME, Slusarczyk A, Dilger EK, Krahe TE, Kucuk C, Guido W. 2010. Synaptic development of the mouse dorsal lateral geniculate nucleus. *J Comp Neurol.* 518:622-635.
- Bickford ME, Zhou N, Krahe TE, Govindaiah G, Guido W. 2015. Retinal and Tectal «Driver-Like» Inputs Converge in the Shell of the Mouse Dorsal Lateral Geniculate Nucleus. *J Neurosci.* 35:10523-10534.
- Blake R, Cool SJ, Crawford ML. 1974. Visual resolution in the cat. *Vision Res.* 14:1211-1217.
- Blasco B, Avendaño C, Cavada C. 1999. A stereological analysis of the lateral geniculate nucleus in adult *Macaca nemestrina* monkeys. *Vis Neurosci.* 16:933-941.
- Bleckert A, Schwartz GW, Turner MH, Rieke F, Wong ROL. 2014. Visual space is represented by nonmatching topographies of distinct mouse retinal ganglion cell types. *Curr Biol.* 24:310-315.
- Boline J, Lee E-F, Toga AW. 2008. Digital atlases as a framework for data sharing. *Front Neurosci.* 2:100-107.

- Bopp R, Holler-Rickauer S, Martin KAC, Schuhknecht GFP. 2017. An Ultrastructural Study of the Thalamic Input to Layer 4 of Primary Motor and Primary Somatosensory Cortex in the Mouse. *J Neurosci.* 37:2435-2448.
- Bota M, Sporns O, Swanson LW. 2015. Architecture of the cerebral cortical association connectome underlying cognition. *Proc Natl Acad Sci.* 112:E2093-E2101.
- Bourassa J, Deschênes M. 1995. Corticothalamic projections from the primary visual cortex in rats: a single fiber study using biocytin as an anterograde tracer. *Neuroscience.* 66:253-263.
- Bridge H, Leopold DA, Bourne JA. 2016. Adaptive Pulvinar Circuitry Supports Visual Cognition. *Trends Cogn Sci.* 20:146-157.
- Brown TS, Marco LA. 1967. Effects of stimulation of the superior colliculus and lateral thalamus on visual evoked potentials. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 22:150-158.
- Budisantoso T, Matsui K, Kamasawa N, Fukazawa Y, Shigemoto R. 2012. Mechanisms Underlying Signal Filtering at a Multisynapse Contact. *J Neurosci.* 32:2357-2376.
- Bullier J, Kennedy H, Salinger W. 1984a. Branching and laminar origin of projections between visual cortical areas in the cat. *J Comp Neurol.* 228:329-341.
- Bullier J, Kennedy H, Salinger W. 1984b. Bifurcation of subcortical afferents to visual areas 17, 18, and 19 in the cat cortex. *J Comp Neurol.* 228:309-328.
- Burdach K. 1982. Vom Baue und Leben des Gehirns. 3rd ed. Leipzig, Germany: Dykschen Buchhandlung.
- Burwell RD, Hafeman DM. 2003. Positional firing properties of postrhinal cortex neurons. *Neuroscience.* 119:577-588.
- Byne W, Buchsbaum MS, Mattiace LA, Hazlett EA, Kemether E, Elhakem SL, Purohit DP, Haroutunian V, Jones L. 2002. Postmortem assessment of thalamic nuclear volumes in subjects with schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 159:59-65.
- Calabrese E, Badea A, Cofer G, Qi Y, Johnson GA. 2015. A Diffusion MRI Tractography Connectome of the Mouse Brain and Comparison with Neuronal Tracer Data. *Cereb Cortex.* 25:4628-4637.
- Callaway EM. 2004. Feedforward, feedback and inhibitory connections in primate visual cortex. *Neural Networks.* 17:625-632.
- Callaway EM. 2005. Structure and function of parallel pathways in the primate early visual system. *J Physiol.* 566:13-19.
- Callaway EM, Luo L. 2015. Monosynaptic Circuit Tracing with Glycoprotein-Deleted Rabies Viruses. *J Neurosci.* 35:8979-8985.
- Carcieri SM, Jacobs AL, Nirenberg S. 2003. Classification of retinal ganglion cells: a statistical approach. *J Neurophysiol.* 90:1704-1713.
- Carey RG, Neal TL. 1985. The rat claustrum: afferent and efferent connections with visual cortex. *Brain Res.* 329:185-193.
- Carter-Dawson LD, Lavail MM. 1979. Rods and cones in the mouse retina. I. Structural analysis using light and electron microscopy. *J Comp Neurol.* 188:245-262.
- Casanova C, Merabet L, Desautels A, Minville K. 2001. Higher-order motion processing in the

- pulvinar. *Prog Brain Res.* 134:71-82.
- Castle MJ, Gershenson ZT, Giles AR, Holzbaur ELF, Wolfe JH. 2014. Adeno-associated virus serotypes 1, 8, and 9 share conserved mechanisms for anterograde and retrograde axonal transport. *Hum Gene Ther.* 25:705-720.
- Castro-Alamancos MA, Connors BW. 1996. Spatiotemporal properties of short-term plasticity sensorimotor thalamocortical pathways of the rat. *J Neurosci.* 16:2767-2779.
- Caviness VS. 1975. Architectonic map of neocortex of the normal mouse. *J Comp Neurol.* 164:247-263.
- Caviness VS, Frost DO. 1980. Tangential organization of thalamic projections to the neocortex in the mouse. *J Comp Neurol.* 194:335-367.
- Cebrián C, Parent A, Prensa L. 2005. Patterns of axonal branching of neurons of the substantia nigra pars reticulata and pars lateralis in the rat. *J Comp Neurol.* 492:349-369.
- Chalupa L, Williams R. 2008. *Eye, Retina, and Visual System of the Mouse.* Cambridge, Massachusetts: MIT Press.
- Chalupa LM. 1981. Some observations on the functional organization of the golden hamster's visual system. *Behav Brain Res.* 3:189-200.
- Chalupa LM, Abramson BP. 1988. Receptive-field properties in the tecto- and striate-recipient zones of the cat's lateral posterior nucleus. *Prog Brain Res.* 75:85-94.
- Chamberlin NL, Du B, De Lacalle S, Saper CB. 1998. Recombinant adeno-associated virus vector: Use for transgene expression and anterograde tract tracing in the CNS. *Brain Res.* 793:169-175.
- Chandler HC, King V, Corwin J V., Reep RL. 1992. Thalamocortical connections of rat posterior parietal cortex. *Neurosci Lett.* 143:237-242.
- Cheatwood JL, Corwin J V, Reep RL. 2005. Overlap and interdigitation of cortical and thalamic afferents to dorsocentral striatum in the rat. *Brain Res.* 1036:90-100.
- Cheatwood JL, Reep RL, Corwin J V. 2003. The Associative Striatum: Organization of Cortical Projections to the Dorsocentral Striatum in Rats. *J Comp Neurol.* 467:271-292.
- Chen C, Regehr WG. 2000. Developmental remodeling of the retinogeniculate synapse. *Neuron.* 28:955-966.
- Cho J, Sharp PE. 2001. Head direction, place, and movement correlates for cells in the rat retrosplenial cortex. *Behav Neurosci.* 115:3-25.
- Choi J-H, Yu N-K, Baek G-C, Bakes J, Seo D, Nam HJ, Baek SH, Lim C-S, Lee Y-S, Kaang B-K. 2014. Optimization of AAV expression cassettes to improve packaging capacity and transgene expression iChoi J-H, Yu N-K, Baek G-C, Bakes J, Seo D, Nam HJ, Baek SH, Lim C-S, Lee Y-S, Kaang B-K. 2014. Optimization of AAV expression cassettes to improve packaging . *Mol Brain.* 7:17.
- Chomsung RD, Petry HM, Bickford ME. 2008. Ultrastructural examination of diffuse and specific tectopulvinar projections in the tree shrew. *J Comp Neurol.* 510:24-46.
- Chomsung RD, Wei H, Day-Brown JD, Petry HM, Bickford ME. 2010. Synaptic Organization of Connections between the Temporal Cortex and Pulvinar Nucleus of the Tree Shrew. *Cereb Cortex.* 20:997-1011.

- Choudhury BP. 1978. Retinotopic organization of the guinea pig's visual cortex. *Brain Res.* 144:19-29.
- Clascá F, Porrero C, Galazo M, Rubio-Garrido P, Evangelio M. 2016. Anatomy and Development of Multispecific Thalamocortical Axons: Implications for Cortical Dynamics and Evolution. En: Rockland K, editor. *Axons and brain architecture*. Elsevier Science.
- Clascá F, Rubio-Garrido P, Jabaudon D. 2012. Unveiling the diversity of thalamocortical neuron subtypes. *Eur J Neurosci.* 35:1524-1532.
- Cleland BG, Dubin MW, Levick WR. 1971. Sustained and transient neurones in the cat's retina and lateral geniculate nucleus. *J Physiol.* 217:473-496.
- Coizet V, Overton PG, Redgrave P. 2007. Collateralization of the tectonigral projection with other major output pathways of superior colliculus in the rat. *J Comp Neurol.* 500:1034-1049.
- Coleman J, Clerici WJ. 1980. Extrastriate projections from thalamus to posterior occipital-temporal cortex in rat. *Brain Res.* 194:205-209.
- Coleman JE, Law K, Bear MF. 2009. Anatomical origins of ocular dominance in mouse primary visual cortex. *Neuroscience.* 161:561-571.
- Colonnier M, Guillery RW. 1964. Synaptic organization in the lateral geniculate nucleus of the monkey. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 62:333-355.
- Condé F, Maire-Lepoivre E, Audinat E, Crépel F. 1995. Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. II. Cortical and subcortical afferents. *J Comp Neurol.* 352:567-593.
- Conte WL, Kamishina H, Corwin J V, Reep RL. 2008. Topography in the projections of lateral posterior thalamus with cingulate and medial agranular cortex in relation to circuitry for directed attention and neglect. 87-95.
- Conte WL, Kamishina H, Reep RL. 2009. The efficacy of the fluorescent conjugates of cholera toxin subunit B for multiple retrograde tract tracing in the central nervous system. *Brain Struct Funct.* 213:367-373.
- Coogan T a, Burkhalter A. 1993. Hierarchical organization of areas in rat visual cortex. *J Neurosci.* 13:3749-3772.
- Coogan TA, Burkhalter A. 1990. Conserved patterns of cortico-cortical connections define areal hierarchy in rat visual cortex. *Exp brain Res.* 80:49-53.
- Coombs J, van der List D, Wang G-Y, Chalupa LM. 2006. Morphological properties of mouse retinal ganglion cells. *Neuroscience.* 140:123-136.
- Córdoba-Claros A. 2017. Arquitectura y conexiones tálamo-corticales del núcleo pulvinar medial en el mono tití común (*Callithrix jacchus*).
- Cowey A. 2010. The blindsight saga. *Exp Brain Res.* 200:3-24.
- Cowey A, Henken DB, Perry VH. 1982. Effects on visual acuity of neonatal or adult tectal ablation in rats. *Exp brain Res.* 48:149-152.
- Coyle JT, Snyder SH. 1969. Antiparkinsonian drugs: inhibition of dopamine uptake in the corpus striatum as a possible mechanism of action. *Science.* 166:899-901.
- Crain BJ, Hall WC. 1980. The normal organization of the lateral posterior nucleus of the golden hamster. *J Comp Neurol.* 193:351-370.

- Cruz-Martín A, El-Danaf RN, Osakada F, Sriram B, Dhande OS, Nguyen PL, Callaway EM, Ghosh A, Huberman AD. 2014. A dedicated circuit links direction-selective retinal ganglion cells to the primary visual cortex. *Nature*. 507:358-361.
- Cruz-Martín A, Huberman AD. 2012. Visual Cognition: Rats Compare Shapes Among the Crowd. *Curr Biol*. 22:R18-R20.
- Cudeiro J, González F, Pérez R, Alonso JM, Acuña C. 1989. Does the pulvinar-LP complex contribute to motor programming? *Brain Res*. 484:367-370.
- Cudeiro J, Sillito AM. 1996. Spatial frequency tuning of orientation-discontinuity-sensitive corticofugal feedback to the cat lateral geniculate nucleus. *J Physiol*. 490 (Pt 2):481-492.
- Cusick CG, Lund RD. 1981. The distribution of the callosal projection to the occipital visual cortex in rats and mice. *Brain Res*. 214:239-259.
- Cusick CG, MacAvoy MG, Kaas JH. 1985. Interhemispheric connections of cortical sensory areas in tree shrews. *J Comp Neurol*. 235:111-128.
- Czajkowski R, Jayaprakash B, Wiltgen B, Rogerson T, Guzman-Karlsson MC, Barth AL, Trachtenberg JT, Silva AJ. 2014. Encoding and storage of spatial information in the retrosplenial cortex. *Proc Natl Acad Sci*. 111:8661-8666.
- da Costa NM, Martin KAC. 2011. How Thalamus Connects to Spiny Stellate Cells in the Cat's Visual Cortex. *J Neurosci*. 31:2925-2937.
- Davies M, Machin P, Sanderson D, Pearce J, Aggleton J. 2007. Neurotoxic lesions of the rat perirhinal and postrhinal cortices and their impact on biconditional visual discrimination tasks. *Behav Brain Res*. 176:274-283.
- Day-Brown JD, Wei H, Chomsung RD, Petry HM, Bickford ME. 2010a. Pulvinar Projections to the Striatum and Amygdala in the Tree Shrew. *Front Neuroanat*. 4.
- Day-Brown JD, Wei H, Chomsung RD, Petry HM, Bickford ME. 2010b. Pulvinar projections to the striatum and amygdala in the tree shrew. *Front Neuroanat*. 4:143.
- De Vry J, Martínez-Martínez P, Losen M, Temel Y, Steckler T, Steinbusch HWM, De Baets MH, Prickaerts J. 2010. In vivo electroporation of the central nervous system: A non-viral approach for targeted gene delivery. *Prog Neurobiol*. 92:227-244.
- Delwig A, Logan AM, Copenhagen DR, Ahn AH. 2012. Light Evokes Melanopsin-Dependent Vocalization and Neural Activation Associated with Aversive Experience in Neonatal Mice. *PLoS One*. 7:e43787.
- Demb JB, Singer JH. 2015. Functional Circuitry of the Retina. *Annu Rev Vis Sci*. 1:263-289.
- Dempsey E, Morison R. 1942. The production of rhythmically recurrent cortical potentials after localized thalamic stimulation. *Am J Physiol*. 135:301-308.
- Denman DJ, Siegle JH, Koch C, Reid RC, Blanche TJ. 2017. Spatial Organization of Chromatic Pathways in the Mouse Dorsal Lateral Geniculate Nucleus. *J Neurosci*. 37:1102-1116.
- Deschênes M, Bourassa J, Doan VD, Parent A. 1996. A single-cell study of the axonal projections arising from the posterior intralaminar thalamic nuclei in the rat. *Eur J Neurosci*. 8:329-343.
- Desimone R, Wessinger M, Thomas L, Schneider W. 1990. Attentional control of visual perception: cortical and subcortical mechanisms. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 55:963-971.

- Dhande OS, Crair MC. 2011. Transfection of mouse retinal ganglion cells by in vivo electroporation. *J Vis Exp*. 43:12-15.
- Dhande OS, Hua EW, Guh E, Yeh J, Bhatt S, Zhang Y, Ruthazer ES, Feller MB, Crair MC. 2011. Development of Single Retinofugal Axon Arbors in Normal and 2 Knock-Out Mice. *J Neurosci*. 31:3384-3399.
- Dhande OS, Huberman AD. 2014a. Retinal ganglion cell maps in the brain: implications for visual processing. *Curr Opin Neurobiol*. 24:133-142.
- Dhande OS, Huberman AD. 2014b. Retinal ganglion cell maps in the brain: implications for visual processing. *Curr Opin Neurobiol*. 24:133-142.
- Dhande OS, Huberman AD. 2014c. Visual Circuits: Mouse Retina No Longer a Level Playing Field. *Curr Biol*. 24:R155-R156.
- Diamond IT. 1976. Organization of the visual cortex: comparative anatomical and behavioral studies. *Fed Proc*. 35:60-67.
- Diamond IT, Hall WC. 1969. Evolution of neocortex. *Science*. 164:251-262.
- Dick A, Kaske A, Creutzfeldt OD. 1991. Topographical and topological organization of the thalamocortical projection to the striate and prestriate cortex in the marmoset (*Callithrix jacchus*). *Exp brain Res*. 84:233-253.
- Dobrunz LE, Stevens CF. 1997. Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. *Neuron*. 18:995-1008.
- Donnelly JF, Thompson SM, Robertson RT. 1983. Organization of projections from the superior colliculus to the thalamic lateral posterior nucleus in the rat. *Brain Res*. 288:315-319.
- Doron NN, Ledoux JE. 1999. Organization of projections to the lateral amygdala from auditory and visual areas of the thalamus in the rat. *J Comp Neurol*. 412:383-409.
- Doron NN, Ledoux JE. 2000. Cells in the posterior thalamus project to both amygdala and temporal cortex: a quantitative retrograde double-labeling study in the rat. *J Comp Neurol*. 425:257-274.
- Dorph-Petersen K-A, Caric D, Saghafi R, Zhang W, Sampson AR, Lewis DA. 2009. Volume and neuron number of the lateral geniculate nucleus in schizophrenia and mood disorders. *Acta Neuropathol*. 117:369-384.
- Drager U. 1974. Autoradiography of tritiated prline and fucose transported transneuronally from eye to visual-cortex in pigmented and albion mice. *Brain Res*. 82:284-292.
- Drager UC. 1975. Receptive fields of single cells and topography in mouse visual cortex. *J Comp Neurol*. 160:269-290.
- Dräger UC. 1975a. Receptive fields of single cells and topography in mouse visual cortex. *J Comp Neurol*. 160:269-289.
- Dräger UC. 1975b. Receptive fields of single cells and topography in mouse visual cortex. *J Comp Neurol*. 160:269-289.
- Dräger UC. 1978. Observations on monocular deprivation in mice. *J Neurophysiol*. 41:28-42.
- Dräger UC, Hubel DH. 1976. Topography of visual and somatosensory projections to mouse superior colliculus. *J Neurophysiol*. 39:91-101.

- Dräger UC, Olsen JF. 1980. Origins of crossed and uncrossed retinal projections in pigmented and albino mice. *J Comp Neurol*. 191:383-412.
- Dräger UC, Olsen JF. 1981. Ganglion cell distribution in the retina of the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 20:285-293.
- Dreher B, Dehay C, Bullier J. 1990. Bihemispheric Collateralization of the Cortical and Subcortical Afferents to the Rat's Visual Cortex. *Eur J Neurosci*. 2:317-331.
- Dumbrava D, Faubert J, Casanova C. 2001. Global motion integration in the cat's lateral posterior-pulvinar complex. *Eur J Neurosci*. 13:2218-2226.
- Dürsteler MR, Blakemore C, Garey LJ. 1979. Projections to the visual cortex in the golden hamster. *J Comp Neurol*. 183:185-204.
- Dursun I, Jakubowska-Doğru E, Elibol-Can B, van der List D, Chapman B, Qi L, Berman RF. 2013. Effects of early postnatal alcohol exposure on the developing retinogeniculate projections in C57BL/6 mice. *Alcohol*. 47:173-179.
- Eacott MJ, Gaffan EA. 2005. The roles of perirhinal cortex, postrhinal cortex, and the fornix in memory for objects, contexts, and events in the rat. *Q J Exp Psychol B*. 58:202-217.
- Ellis EM, Gauvain G, Sivyer B, Murphy GJ. 2016. Shared and distinct retinal input to the mouse superior colliculus and dorsal lateral geniculate nucleus. *J Neurophysiol*. 116:602-610.
- Erro EM, Lanciego JL, Gimenez-Amaya JM. 2002. Re-examination of the thalamostriatal projections in the rat with retrograde tracers. *Neurosci Res*. 42:45-55.
- Espinoza SG, Thomas HC. 1983. Retinotopic organization of striate and extrastriate visual cortex in the hooded rat. *Brain Res*. 272:137-144.
- Essen DC Van. 1979. *Mammalian Cerebral Cortex*. 6.1.
- Etienne AS, Maurer R, Séguinot V. 1996. Path integration in mammals and its interaction with visual landmarks. *J Exp Biol*. 199:201-209.
- Familtsev D, Quiggins R, Masterson SP, Dang W, Slusarczyk AS, Petry HM, Bickford ME. 2016. Ultrastructure of geniculocortical synaptic connections in the tree shrew striate cortex. *J Comp Neurol*. 524:1292-1306.
- Feinberg EH, Meister M. 2015. Orientation columns in the mouse superior colliculus. *Nature*. 519:229-232.
- Felleman DJ, Van Essen DC. 1991. Distributed hierarchical processing in the primate cerebral cortex. *Cereb Cortex*. 1:1-47.
- Feng D, Lau C, Ng L, Li Y, Kuan L, Sunkin SM, Dang C, Hawrylycz M. 2015. Exploration and visualization of connectivity in the adult mouse brain. *Methods*. 73:90-97.
- Fitzpatrick D, Itoh K, Diamond IT. 1983. The laminar organization of the lateral geniculate body and the striate cortex in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *J Neurosci*. 3:673-702.
- Florence SL, Casagrande VA. 1987. Organization of individual afferent axons in layer IV of striate cortex in a primate. *J Neurosci*. 7:3850-3868.
- Frangeul L, Porrero C, Garcia-Amado M, Maimone B, Maniglier M, Clascá F, Jabaudon D. 2014. Specific activation of the paralemniscal pathway during nociception. *Eur J Neurosci*. 39:1455-1464.

- Franklin G, Paxinos K. 2008. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 3rd ed. San Diego: Academic Press.
- Frontera JG. 1956. Some results obtained by electrical stimulation of the cortex of the island of Reil in the brain of the monkey (*Macaca mulatta*). *J Comp Neurol*. 105:365-394.
- Frost DO, Caviness VS. 1980. Radial organization of thalamic projections to the neocortex in the mouse. *J Comp Neurol*. 194:369-393.
- Fukuda Y, Stone J. 1974. Retinal distribution and central projections of Y-, X-, and W-cells of the cat's retina. *J Neurophysiol*. 37:749-772.
- Funaki S, Meguro R, Abe H, Norita M. 1998. The organization of the thalamostriatal projection from the lateral posterior thalamic nuclear complex (LP) in the pigmented rat. *Neurobiology (Bp)*. 6:273-294.
- Furman M, Xu H-P, Crair MC. 2013. Competition driven by retinal waves promotes morphological and functional synaptic development of neurons in the superior colliculus. *J Neurophysiol*. 110:1441-1454.
- Furtak SC, Allen TA, Brown TH. 2007. Single-Unit Firing in Rat Perirhinal Cortex Caused by Fear Conditioning to Arbitrary and Ecological Stimuli. *J Neurosci*. 27:12277-12291.
- Furtak SC, Wei S-M, Agster KL, Burwell RD. 2007. Functional neuroanatomy of the parahippocampal region in the rat: The perirhinal and postrhinal cortices. *Hippocampus*. 17:709-722.
- Furuta T, Tomioka R, Taki K, Nakamura K, Tamamaki N, Kaneko T. 2001. In vivo transduction of central neurons using recombinant Sindbis virus: Golgi-like labeling of dendrites and axons with membrane-targeted fluorescent proteins. *J Histochem Cytochem*. 49:1497-1508.
- Gale SD, Murphy GJ. 2014. Distinct representation and distribution of visual information by specific cell types in mouse superficial superior colliculus. *J Neurosci*. 34:13458-13471.
- Gallardo L, Mottles M, Vera L, Carrasco M, Torrealba F, Montero V, Pinto-Hamuy T. 1979. Failure by rats to learn a visual conditional discrimination after lateral peristriate cortical lesions. *Physiol Psychol*. 7:173-177.
- Gallyas F. 1979. Histochemistry Kinetics of Formation of Metallic Silver and Binding. 96:87-96.
- Galvan A, Smith Y. 2011. The primate thalamostriatal systems: Anatomical organization, functional roles and possible involvement in Parkinson's disease. *Basal Ganglia*. 1:179-189.
- Gao G, Vandenberghe LH, Alvira MR, Lu Y, Calcedo R, Zhou X, Wilson JM. 2004. Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol*. 78:6381-6388.
- Gao G, Vandenberghe LH, Wilson JM. 2005. New recombinant serotypes of AAV vectors. *Curr Gene Ther*. 5:285-297.
- Garrett ME, Nauhaus I, Marshel JH, Callaway EM. 2014. Topography and areal organization of mouse visual cortex. *J Neurosci*. 34:12587-12600.
- Gharbawie OA, Stepniewska I, Kaas JH. 2011. Cortical connections of functional zones in posterior parietal cortex and frontal cortex motor regions in new world monkeys. *Cereb Cortex*. 21:1981-2002.
- Gianfranceschi L, Fiorentini A, Maffei L. 1999. Behavioural visual acuity of wild type and bcl2 transgenic mouse. *Vision Res*. 39:569-574.

- Girman S V., Lund RD. 2007. Most Superficial Sublamina of Rat Superior Colliculus: Neuronal Response Properties and Correlates With Perceptual Figure-Ground Segregation. *J Neurophysiol.* 98:161-177.
- Glickfeld LL, Reid RC, Andermann ML. 2014. A mouse model of higher visual cortical function. *Curr Opin Neurobiol.* 24:28-33.
- Godement P, Salaün J, Imbert M. 1984. Prenatal and postnatal development of retinogeniculate and retinocollicular projections in the mouse. *J Comp Neurol.* 230:552-575.
- Golding B, Pouchelon G, Bellone C, Murthy S, Di Nardo AA, Govindan S, Ogawa M, Shimogori T, Lüscher C, Dayer A, Jabaudon D. 2014. Retinal input directs the recruitment of inhibitory interneurons into thalamic visual circuits. *Neuron.* 81:1057-1069.
- Goossens L, Schruers K, Peeters R, Griez E, Sunaert S. 2007. Visual presentation of phobic stimuli: Amygdala activation via an extrageniculostriate pathway? *Psychiatry Res Neuroimaging.* 155:113-120.
- Gordon JA, Stryker MP. 1996. Experience-dependent plasticity of binocular responses in the primary visual cortex of the mouse. *J Neurosci.* 16:3274-3286.
- Graham J. 1977. An autoradiographic study of the efferent connections of the superior colliculus in the cat. *J Comp Neurol.* 173:629-654.
- Graybiel AM. 1972. Some extrageniculate visual pathways in the cat. *Invest Ophthalmol.* 11:322-332.
- Grieve KL, Acuña C, Cudeiro J. 2000. The primate pulvinar nuclei: vision and action. *Trends Neurosci.* 23:35-39.
- Griffin DE. 1998. A review of alphavirus replication in neurons. *Neurosci Biobehav Rev.* 22:721-723.
- Groenewegen HJ, Berendse HW. 1994. The specificity of the «nonspecific» midline and intralaminar thalamic nuclei. *Trends Neurosci.* 17:52-57.
- Grubb MS, Rossi FM, Changeux JP, Thompson ID. 2003a. Abnormal functional organization in the dorsal lateral geniculate nucleus of mice lacking the beta 2 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron.* 40:1161-1172.
- Grubb MS, Rossi FM, Changeux JP, Thompson ID. 2003b. Abnormal functional organization in the dorsal lateral geniculate nucleus of mice lacking the beta 2 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron.* 40:1161-1172.
- Grubb MS, Thompson ID. 2003. Quantitative characterization of visual response properties in the mouse dorsal lateral geniculate nucleus. *J Neurophysiol.* 90:3594-3607.
- Guillery RW. 2003. Branching Thalamic Afferents Link Action and Perception. *J Neurophysiol.* 90:539-548.
- Guillery RW, Feig SL, Van Lieshout DP. 2001. Connections of higher order visual relays in the thalamus: A study of corticothalamic pathways in cats. *J Comp Neurol.* 438:66-85.
- Guillery RW, Sherman SM. 2011. Branched thalamic afferents: What are the messages that they relay to the cortex? *Brain Res Rev.* 66:205-219.
- Gundersen HJ, Jensen EB. 1987. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc.* 147:229-263.

- Gundersen HJG, Jensen EB, Kiêu K, Nielsen J. 1999. The efficiency of systematic sampling in stereology--reconsidered. *J Microsc.* 193:199-211.
- Gurdjian E. 1927. The diencephalon of the albino rat: Studies on the brain of the rat. *Compo Neurol.* 43:1-114.
- Hammer S, Carrillo GL, Govindaiah G, Monavarfeshani A, Bircher JS, Su J, Guido W, Fox M a. 2014. Nuclei-specific differences in nerve terminal distribution, morphology, and development in mouse visual thalamus. *Neural Dev.* 9:16.
- Hammer S, Monavarfeshani A, Lemon T, Su J, Fox MA. 2015. Multiple Retinal Axons Converge onto Relay Cells in the Adult Mouse Thalamus. *Cell Rep.* 12:1575-1583.
- Hanbery J, Jasper H. 1954. The Non-Specific Thalamocortical Projection System. *J Neurosurg.* 11:24-25.
- Hanzel M, Wingate RJT, Butts T. 2015. Ex Vivo Culture of Chick Cerebellar Slices and Spatially Targeted Electroporation of Granule Cell Precursors. *J Vis Exp.* e53421.
- Hardy S, Lynch J. 1992. The spatial distribution of pulvinar neurons that project to two subregions of the inferior parietal lobule in the macaque. *Cereb Cortex.* 2:217-230.
- Harris JA, Oh SW, Zeng H. 2012. Adeno-associated viral vectors for anterograde axonal tracing with fluorescent proteins in nontransgenic and cre driver mice. *Curr Protoc Neurosci.* Chapter 1:Unit 1.20.1-18.
- Harting JK, Glendenning KK, Diamond IT, Hall WC. 1973. Evolution of the primate visual system: Anterograde degeneration studies of the tecto-pulvinar system. *Am J Phys Anthropol.* 38:383-392.
- Harting JK, Huerta MF. 1983. The geniculostriate projection in the grey squirrel: preliminary autoradiographic data. *Brain Res.* 272:341-349.
- Harting JK, Huerta MF, Frankfurter AJ, Strominger NL, Royce GJ. 1980. Ascending pathways from the monkey superior colliculus: an autoradiographic analysis. *J Comp Neurol.* 192:853-882.
- Harting JK, Huerta MF, Hashikawa T, van Lieshout DP. 1991. Projection of the mammalian superior colliculus upon the dorsal lateral geniculate nucleus: Organization of tectogeniculate pathways in nineteen species. *J Comp Neurol.* 304:275-306.
- Harting JK, Updyke B V, Van Lieshout DP. 2001. Striatal projections from the cat visual thalamus. *Eur J Neurosci.* 14:893-896.
- Hashemi-Nezhad M, Wang C, Burke W, Dreher B. 2003. Area 21a of cat visual cortex strongly modulates neuronal activities in the superior colliculus. *J Physiol.* 550:535-552.
- Hattar S, Kumar M, Park A, Tong P, Tung J, Yau K-W, Berson DM. 2006. Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. *J Comp Neurol.* 497:326-349.
- Hattar S, Lucas RJ, Mrosovsky N, Thompson S, Douglas RH, Hankins MW, Lem J, Biel M, Hofmann F, Foster RG, Yau K-W. 2003. Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature.* 424:75-81.
- Haverkamp S, Wässle H. 2000. Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *J Comp Neurol.* 424:1-23.
- Hawrylycz M, Anastassiou C, Arkhipov A, Berg J, Buice M, Cain N, Gouwens NW, Gratiy S, Iyer R, Lee JH, Mihalas S, Mitelut C, Olsen S, Reid RC, Teeter C, de Vries S, Waters J, Zeng H, Koch C. 2016. Inferring cortical function in the mouse visual system through large-scale systems

- neuroscience. *Proc Natl Acad Sci.* 113:7337-7344.
- Hei X, Stoelzel CR, Zhuang J, Bereshpolova Y, Huff JM, Alonso J-M, Swadlow H a. 2014. Directional selective neurons in the awake LGN: Response properties and modulation by brain state. *J Neurophysiol.* 362-373.
- Heise CE, Mitrofanis J. 2004. Evidence for a glutamatergic projection from the zona incerta to the basal ganglia of rats. *J Comp Neurol.* 468:482-495.
- Hendrickson A. 1969. Electron microscopic radioautography: identification of origin of synaptic terminals in normal nervous tissue. *Science.* 165:194-196.
- Herkenham M. 1978. The connections of the nucleus reuniens thalami: Evidence for a direct thalamo-hippocampal pathway in the rat. *J Comp Neurol.* 177:589-609.
- Herkenham M. 1979. The afferent and efferent connections of the ventromedial thalamic nucleus in the rat. *J Comp Neurol.* 183:487-517.
- Herkenham M. 1980a. Laminar organization of thalamic projections to the rat neocortex. *Science.* 207:532-535.
- Herkenham M. 1980b. Laminar Organization. *Science* (80-). 207:532-535.
- Herrera E, Brown L, Aruga J, Rachel RA, Dolen G, Mikoshiba K, Brown S, Mason CA. 2003. Zic2 patterns binocular vision by specifying the uncrossed retinal projection. *Cell.* 114:545-557.
- Hicks RR, Huerta MF. 1991. Differential thalamic connectivity of rostral and caudal parts of cortical area Fr2 in rats. *Brain Res.* 568:325-329.
- Hill S, Tononi G. 2004. Modeling Sleep and Wakefulness in the Thalamocortical System. *J Neurophysiol.* 93:1671-1698.
- Hofbauer A, Dräger UC. 1985. Depth Segregation of Retinal Ganglion Cells Projecting to Mouse Superior Colliculus. *J Comp Neurol.* 474:465-474.
- Hong YK, Chen C. 2011. Wiring and rewiring of the retinogeniculate synapse. *Curr Opin Neurobiol.* 21:228-237.
- Hooks BM, Mao T, Gutnisky DA, Yamawaki N, Svoboda K, Shepherd GMG. 2013. Organization of Cortical and Thalamic Input to Pyramidal Neurons in Mouse Motor Cortex. *J Neurosci.* 33:748-760.
- Hoover WB, Vertes RP. 2007. Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Struct Funct.* 212:149-179.
- Hoover WB, Vertes RP. 2011. Projections of the medial orbital and ventral orbital cortex in the rat. *J Comp Neurol.* 519:3766-3801.
- Horikawa K, Armstrong WE. 1988. A versatile means of intracellular labeling: injection of biocytin and its detection with avidin conjugates. *J Neurosci Methods.* 25:1-11.
- Howarth M, Walmsley L, Brown TM. 2014. Binocular integration in the mouse lateral geniculate nuclei. *Curr Biol.* 24:1241-1247.
- Hubel DH, Wiesel TN. 1962. Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J Physiol.* 160:106-154.
- Hubel DH, Wiesel TN. 1968. Receptive fields and functional architecture of monkey striate cortex. *J Physiol.* 195:215-243.

- Hubel DH, Wiesel TN. 1969. Anatomical demonstration of columns in the monkey striate cortex. *Nature*. 221:747-750.
- Hubel DH, Wiesel TN. 1972. Laminar and columnar distribution of geniculo-cortical fibers in the macaque monkey. *J Comp Neurol*. 146:421-450.
- Huberman AD, Feller MB, Chapman B. 2008. Mechanisms Underlying Development of Visual Maps and Receptive Fields. *Annu Rev Neurosci*. 31:479-509.
- Huberman AD, Manu M, Koch SM, Susman MW, Lutz AB, Ullian EM, Baccus SA, Barres BA. 2008. Architecture and Activity-Mediated Refinement of Axonal Projections from a Mosaic of Genetically Identified Retinal Ganglion Cells. *Neuron*. 59:425-438.
- Huberman AD, Niell CM. 2011. What can mice tell us about how vision works? *Trends Neurosci*. 34:464-473.
- Huberman AD, Wang G-Y, Liets LC, Collins OA, Chapman B, Chalupa LM. 2003. Eye-Specific Retinogeniculate Segregation Independent of Normal Neuronal Activity. *Science* (80-). 300:994-998.
- Huerta MF, Krubitzer LA, Kaas JH. 1987. Frontal eye field as defined by intracortical microstimulation in squirrel monkeys, owl monkeys, and macaque monkeys. II. Cortical connections. *J Comp Neurol*. 265:332-361.
- Hughes HC. 1977. Anatomical and neurobehavioral investigations concerning the thalamo-cortical organization of the rat's visual system. *J Comp Neurol*. 175:311-335.
- Hughes S, Watson TS, Foster RG, Peirson SN, Hankins MW. 2013. Nonuniform Distribution and Spectral Tuning of Photosensitive Retinal Ganglion Cells of the Mouse Retina. *Curr Biol*. 23:1696-1701.
- Hunnicutt BJ, Long BR, Kusefoglul D, Gertz KJ, Zhong H, Mao T. 2014. A comprehensive thalamocortical projection map at the mesoscopic level. *Nat Neurosci*. 17:1276-1285.
- Ichida JM, Mavity-Hudson JA, Casagrande VA. 2014. Distinct patterns of corticogeniculate feedback to different layers of the lateral geniculate nucleus. *Eye Brain*. 2014:57-73.
- Isbell L. 2009. *The Fruit, The Tree and The Serpent*. Harvard University Press.
- Itaya SK, van Hoesen GW. 1982. WGA-HRP as a transneuronal marker in the visual pathways of monkey and rat. *Brain Res*. 236:199-204.
- Jankowska E, Rastad J, Westman J. 1976. Intracellular application of horseradish peroxidase and its light and electron microscopical appearance in spinocervical tract cells. *Brain Res*. 105:557-562.
- Jasper H. 1949. Diffuse projection systems: the integrative action of the thalamic reticular system. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1:405-19-20.
- Jaubert-Miazza L, Green E, Lo F-S, Bui K, Mills J, Guido W. 2005. Structural and functional composition of the developing retinogeniculate pathway in the mouse. *Vis Neurosci*. 22:661-676.
- Jezzini A, Rozzi S, Borra E, Gallese V, Caruana F, Gerbella M. 2015. A shared neural network for emotional expression and perception: an anatomical study in the macaque monkey. *Front Behav Neurosci*. 9:243.
- Ji W, Gămănuț R, Bista P, D'Souza RD, Wang Q, Burkhalter A. 2015. Modularity in the Organization of Mouse Primary Visual Cortex. *Neuron*. 87.

- Jiang Y, Johnson GA. 2011. Microscopic diffusion tensor atlas of the mouse brain. *Neuroimage*. 56:1235-1243.
- Joesch M, Meister M. 2016. A neuronal circuit for colour vision based on rod–cone opponency. *Nature*. 532:236-239.
- Johnson GA, Badea A, Brandenburg J, Cofer G, Fubara B, Liu S, Nissanov J. 2010. Waxholm space: an image-based reference for coordinating mouse brain research. *Neuroimage*. 53:365-372.
- Johnson J, Wu V, Donovan M, Majumdar S, Renteria RC, Porco T, Van Gelder RN, Copenhagen DR. 2010. Melanopsin-dependent light avoidance in neonatal mice. *Proc Natl Acad Sci*. 107:17374-17378.
- Jones EG. 1983. Lack of collateral thalamocortical projections to fields of the first somatic sensory cortex in monkeys. *Exp brain Res*. 52:375-384.
- Jones EG. 1998. Viewpoint: The core and matrix of thalamic organization. *Neuroscience*. 85:331-345.
- Jones EG. 2001. The thalamic matrix and thalamocortical synchrony. *Trends Neurosci*. 24:595-601.
- Jones EG. 2002. Thalamic circuitry and thalamocortical synchrony. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 357:1659-1673.
- Jones EG. 2007. *The Thalamus*. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- Jones EG. 2009. Synchrony in the interconnected circuitry of the thalamus and cerebral cortex. *Ann N Y Acad Sci*. 1157:10-23.
- Jones EG, Burton H. 1974. Cytoarchitecture and somatic sensory connectivity of thalamic nuclei other than the ventrobasal complex in the cat. *J Comp Neurol*. 154:395-432.
- Jones EG, Hendry SHC. 1989. Differential Calcium Binding Protein Immunoreactivity Distinguishes Classes of Relay Neurons in Monkey Thalamic Nuclei. *Eur J Neurosci*. 1:222-246.
- Jones EG, Leavitt RY. 1974. Retrograde axonal transport and the demonstration of non-specific projections to the cerebral cortex and striatum from thalamic intralaminar nuclei in the rat, cat and monkey. *J Comp Neurol*. 154:349-377.
- Kaas JH, Lyon DC. 2007. Pulvinar contributions to the dorsal and ventral streams of visual processing in primates. *Brain Res Rev*. 55:285-296.
- Kaas JH, Lyon DC. 2008. Processing in Primates. *Brain Res*. 55:285-296.
- Kalatsky VA, Stryker MP. 2003. New paradigm for optical imaging: Temporally encoded maps of intrinsic signal. *Neuron*. 38:529-545.
- Kamishina H, Conte WL, Patel SS, Tai RJ, Corwin J V., Reep RL. 2009. Cortical connections of the rat lateral posterior thalamic nucleus. *Brain Res*. 1264:39-56.
- Kamishina H, Yurcisin GH, Corwin J V., Reep RL. 2008. Striatal projections from the rat lateral posterior thalamic nucleus. *Brain Res*. 1204:24-39.
- Katzner S, Weigelt S. 2013. Visual cortical networks: Of mice and men. *Curr Opin Neurobiol*. 23:202-206.

- Kaufman EF, Rosenquist AC, Raczkowski D. 1984. The projections of single thalamic neurons onto multiple visual cortical areas in the cat. *Brain Res.* 298:171-174.
- Kay JN, De la Huerta I, Kim I-J, Zhang Y, Yamagata M, Chu MW, Meister M, Sanes JR. 2011. Retinal ganglion cells with distinct directional preferences differ in molecular identity, structure, and central projections. *J Neurosci.* 31:7753-7762.
- Kim I-J, Zhang Y, Meister M, Sanes JR. 2010. Laminar restriction of retinal ganglion cell dendrites and axons: subtype-specific developmental patterns revealed with transgenic markers. *J Neurosci.* 30:1452-1462.
- Kim J, Dittgen T, Nimmerjahn A, Waters J, Pawlak V, Helmchen F, Schlesinger S, Seeburg PH, Osten P. 2004. Sindbis vector SINrep(nsP2S726): a tool for rapid heterologous expression with attenuated cytotoxicity in neurons. *J Neurosci Methods.* 133:81-90.
- Kishan AU, Lee CC, Winer JA. 2008. Branched projections in the auditory thalamocortical and corticocortical systems. *Neuroscience.* 154:283-293.
- Kitamura K, Judkewitz B, Kano M, Denk W, Hausser M. 2008. Targeted patch-clamp recordings and single-cell electroporation of unlabeled neurons in vivo. *Nat Methods.* 5:61-67.
- Klingberg F, Klingberg H. 1980. Participation of thalamic nuclei in the elaboration of conditioned avoidance reflexes of rats. VII. Lesions of the nucleus lateralis posterior. *Acta Biol Med Ger.* 39:979-981.
- Kobayashi K, Hoshino K, Homma S, Takagi S, Norita M. 2007. A possible monosynaptic pathway links the pedunculo pontine tegmental nucleus to thalamostriatal neurons in the hooded rat. *Arch Histol Cytol.*
- Köbber C, Apps R, Bechmann I, Lanciego JL, Mey J, Thanos S. 2000. Current concepts in neuroanatomical tracing. *Prog Neurobiol.* 62:327-351.
- Koch SM, Dela Cruz CG, Hnasko TS, Edwards RH, Huberman AD, Ullian EM. 2011. Pathway-specific genetic attenuation of glutamate release alters select features of competition-based visual circuit refinement. *Neuron.* 71:235-242.
- Kolb B, Walkey J. 1987. Behavioural and anatomical studies of the posterior parietal cortex in the rat. *Behav Brain Res.* 23:127-145.
- Kolliker. 1896. *Handbuch der Gewebelehre des Menschen. Nervensystemen des Menschen und der Thiere.* 6th ed. Engelmann, Leipzig, Germany.
- Kong J-H, Fish DR, Rockhill RL, Masland RH. 2005. Diversity of ganglion cells in the mouse retina: Unsupervised morphological classification and its limits. *J Comp Neurol.* 489:293-310.
- Kordys E, Apetz N, Schneider K, Duncan E, Büschbell B, Rohleder C, Sué M, Drzezga A, Neumaier B, Timmermann L, Endepols H. 2017. Motor impairment and compensation in a hemiparkinsonian rat model: correlation between dopamine depletion severity, cerebral metabolism and gait patterns. *EJNMMI Res.* 7:68.
- Krahe TE, El-Danaf RN, Dilger EK, Henderson SC, Guido W. 2011. Morphologically Distinct Classes of Relay Cells Exhibit Regional Preferences in the Dorsal Lateral Geniculate Nucleus of the Mouse. *J Neurosci.* 31:17437-17448.
- Krieg WJS. 1946. Connections of the cerebral cortex in the albino rat and topography of the cortical areas. *J Comp Neurol.* 84:221-275.
- Kriegs JO, Churakov G, Kiefmann M, Jordan U, Brosius J, Schmitz J. 2006. Retroposed elements

- as archives for the evolutionary history of placental mammals. *PLoS Biol.* 4:e91.
- Krinke G. 2000. *The Laboratory Rat*. London, UK: Academic Press, Elsevier.
- Kuramoto E, Furuta T, Nakamura KC, Unzai T, Hioki H, Kaneko T. 2009. Two types of thalamocortical projections from the motor thalamic nuclei of the rat: A single neuron-tracing study using viral vectors. *Cereb Cortex.* 19:2065-2077.
- Kuramoto E, Ohno S, Furuta T, Unzai T, Tanaka YR, Hioki H, Kaneko T. 2015. Ventral medial nucleus neurons send thalamocortical afferents more widely and more preferentially to layer 1 than neurons of the ventral anterior-ventral lateral nuclear complex in the rat. *Cereb Cortex.* 25:221-235.
- Lane RD, Bennett-Clarke CA, Allan DM, Mooney RD. 1993. Immunochemical heterogeneity in the tecto-LP pathway of the rat. *J Comp Neurol.* 333:210-222.
- Langer T, Lund R. 1974. The upper layers of the superior colliculus of the rat: a Golgi study. *J comp Neurol.* 158:405-436.
- Larsen, Gundersen, Nielsen. 1998. Global spatial sampling with isotropic virtual planes: estimators of length density and total length in thick, arbitrarily orientated sections. *J Microsc.* 191:238-248.
- Lashley K. 1934. The mechanism of vision. III. The projection of the retina upon the primary optic centers of the rat. *Compo Neurol.* 59:341-374.
- LaVail MM, Gorrin GM, Repaci MA, Yasumura D. 1987. Light-induced retinal degeneration in albino mice and rats: strain and species differences. *Prog Clin Biol Res.* 247:439-454.
- Le Gros Clark W. 1932. A morphological study of the lateral geniculate body. *Br J Ophthalmol.* 16:264-284.
- Lee CC, Sherman SM. 2008. Synaptic Properties of Thalamic and Intracortical Inputs to Layer 4 of the First- and Higher-Order Cortical Areas in the Auditory and Somatosensory Systems. *J Neurophysiol.* 100:317-326.
- Lee CC, Sherman SM. 2009. Modulator property of the intrinsic cortical projection from layer 6 to layer 4. *Front Syst Neurosci.* 3:3.
- Lee CC, Sherman SM. 2011. On the classification of pathways in the auditory midbrain, thalamus, and cortex. *Hear Res.* 276:79-87.
- Lee M-J, Cho S-S, Jang H-S, Lim YS, You J-R, Park J, Suh H, Kim J-A, Park J-S, Kim D-K. 2002. Optimal salt concentration of vehicle for plasmid DNA enhances gene transfer mediated by electroporation. *Exp Mol Med.* 34:265-272.
- Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, Boe AF, Boguski MS, Brockway KS, Byrnes EJ, Chen L, Chen L, Chen T-M, Chi Chin M, Chong J, Crook BE, Czaplinska A, Dang CN, Datta S, Dee NR, Desaki AL, Desta T, Diep E, Dolbeare TA, Donelan MJ, Dong H-W, Dougherty JG, Duncan BJ, Ebbert AJ, Eichele G, Estin LK, Faber C, Facer BA, Fields R, Fischer SR, Fliss TP, Frensley C, Gates SN, Glattfelder KJ, Halverson KR, Hart MR, Hohmann JG, Howell MP, Jeung DP, Johnson RA, Karr PT, Kawal R, Kidney JM, Knapik RH, Kuan CL, Lake JH, Laramée AR, Larsen KD, Lau C, Lemon TA, Liang AJ, Liu Y, Luong LT, Michaels J, Morgan JJ, Morgan RJ, Mortrud MT, Mosqueda NF, Ng LL, Ng R, Orta GJ, Overly CC, Pak TH, Parry SE, Pathak SD, Pearson OC, Puchalski RB, Riley ZL, Rockett HR, Rowland SA, Royall JJ, Ruiz MJ, Sarno NR, Schaffnit K, Shapovalova N V., Svisay T, Slaughterbeck CR, Smith SC, Smith KA, Smith BI, Sodt AJ, Stewart NN, Stumpf K-R, Sunkin SM, Sutram M, Tam A, Teemer CD,

- Thaller C, Thompson CL, Varnam LR, Visel A, Whitlock RM, Wahnoutka PE, Wolkey CK, Wong VY, Wood M, Yaylaoglu MB, Young RC, Youngstrom BL, Feng Yuan X, Zhang B, Zwingman TA, Jones AR. 2007. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*. 445:168-176.
- Leopold DA. 2012. Primary visual cortex: awareness and blindsight. *Annu Rev Neurosci*. 35:91-109.
- Létang J, Gaillard A, Roger M. 1998. Specific Invasion of Occipital-to-Frontal Neocortical Grafts by Axons from the Lateral Posterior Thalamic Nucleus Consecutive to Neonatal Lesion of the Rat Occipital Cortex. *Exp Neurol*. 152:64-73.
- Li J, Wang S, Bickford ME. 2003. Comparison of the ultrastructure of cortical and retinal terminals in the rat dorsal lateral geniculate and lateral posterior nuclei. *J Comp Neurol*. 460:394-409.
- Li K, Patel J, Purushothaman G, Marion RT, Casagrande VA. 2013. Retinotopic maps in the pulvinar of bush baby (*Otolemur garnettii*). *J Comp Neurol*. 521:3432-3450.
- Liddell BJ, Brown KJ, Kemp AH, Barton MJ, Das P, Peduto A, Gordon E, Williams LM. 2005. A direct brainstem–amygdala–cortical ‘alarm’ system for subliminal signals of fear. *Neuroimage*. 24:235-243.
- Ling C, Schneider GE, Northmore D, Jhaveri S. 1997. Afferents from the colliculus, cortex, and retina have distinct terminal morphologies in the lateral posterior thalamic nucleus. *J Comp Neurol*. 388:467-483.
- Linke R, De Lima AD, Schwegler H, Pape HC. 1999. Direct synaptic connections of axons from superior colliculus with identified thalamo-amygdaloid projection neurons in the rat: possible substrates of a subcortical visual pathway to the amygdala. *J Comp Neurol*. 403:158-170.
- Liu T, Petrof I, Sherman SM. 2014. Modulatory effects of activation of metabotropic glutamate receptors on GABAergic circuits in the mouse cortex. *J Neurophysiol*. 111:2287-2297.
- Lomber SG. 2002. Learning to see the trees before the forest: Reversible deactivation of the superior colliculus during learning of local and global visual features. *Proc Natl Acad Sci*. 99:4049-4054.
- Lorente de No R. 1938. Architectonics and structure of the cerebral cortex. *Physiol Nerv Syst*. 291-330.
- Lu SM, Lin RC. 1993. Thalamic afferents of the rat barrel cortex: a light- and electron-microscopic study using Phaseolus vulgaris leucoagglutinin as an anterograde tracer. *Somatosens Mot Res*. 10:1-16.
- Lund RD, Lund JS, Wise RP. 1974. The organization of the retinal projection to the dorsal lateral geniculate nucleus in pigmented and albino rats. *J Comp Neurol*. 158:383-403.
- Luo X, Salgueiro Y, Beckerman SR, Lemmon VP, Tsoulfas P, Park KK. 2013. Three-dimensional evaluation of retinal ganglion cell axon regeneration and pathfinding in whole mouse tissue after injury. *Exp Neurol*. 247:653-662.
- Luys J. 1865. Recherches sur le Systeme Nerveux Cerebro-spinal: Sa Structure, ses Fonctions et ses Maladies. Baillière. Paris.
- Lyon DC, Jain N, Kaas JH. 2003. The Visual Pulvinar in Tree Shrews II. Projections of Four Nuclei to Areas of Visual Cortex. *J Comp Neurol*. 467:607-627.

- Macchi G, Bentivoglio M. 1982. The organization of the efferent projections of the thalamic intralaminar nuclei: past, present and future of the anatomical approach. *Ital J Neurol Sci.* 3:83-96.
- Macchi G, Bentivoglio M, Minciacchi D, Molinari M. 1983. Claustroneocortical projections studied in the cat by means of multiple retrograde fluorescent tracing. *J Comp Neurol.* 215:121-134.
- Macchi G, Bentivoglio M, Minciacchi D, Molinari M. 1996. Trends in the anatomical organization and functional significance of the mammalian thalamus. *Ital J Neurol Sci.* 17:105-129.
- Macchi G, Bentivoglio M, Molinari M, Minciacchi D. 1984. The thalamo-caudate versus thalamo-cortical projections as studied in the cat with fluorescent retrograde double labeling. *Exp brain Res.* 54:225-239.
- Malach R. 1989. Patterns of connections in rat visual cortex. *J Neurosci.* 9:3741-3752.
- Marion R, Li K, Purushothaman G, Jiang Y, Casagrande VA. 2013. Morphological and neurochemical comparisons between pulvinar and V1 projections to V2. *J Comp Neurol.* 521:813-832.
- Markram H, Muller E, Ramaswamy S, Reimann MW, Abdellah M, Sanchez CA, Ailamaki A, Alonso-Nanclares L, Antille N, Arsever S, Kahou GAA, Berger TK, Bilgili A, Buncic N, Chalimourda A, Chindemi G, Courcol J-D, Delalandre F, Delattre V, Druckmann S, Dumusc R, Dynes J, Eilemann S, Gal E, Gevaert ME, Ghobril J-P, Gidon A, Graham JW, Gupta A, Haenel V, Hay E, Heinis T, Hernando JB, Hines M, Kanari L, Keller D, Kenyon J, Khazen G, Kim Y, King JG, Kisvarday Z, Kumbhar P, Lasserre S, Le Bé J-V, Magalhães BRC, Merchán-Pérez A, Meystre J, Morrice BR, Muller J, Muñoz-Céspedes A, Muralidhar S, Muthurasa K, Nachbaur D, Newton TH, Nolte M, Ovcharenko A, Palacios J, Pastor L, Perin R, Ranjan R, Riachi I, Rodríguez J-R, Riquelme JL, Rössert C, Sfyrakis K, Shi Y, Shillcock JC, Silberberg G, Silva R, Tauheed F, Telefont M, Toledo-Rodriguez M, Tränkler T, Van Geit W, Díaz JV, Walker R, Wang Y, Zaninetta SM, DeFelipe J, Hill SL, Segev I, Schürmann F. 2015. Reconstruction and Simulation of Neocortical Microcircuitry. *Cell.* 163:456-492.
- Marrocco RT, McClurkin JW, Alkire MT. 1996. The influence of the visual cortex on the spatiotemporal response properties of lateral geniculate nucleus cells. *Brain Res.* 737:110-118.
- Marrocco RT, McClurkin JW, Young R a. 1982. Spatial summation and conduction latency classification of cells of the lateral geniculate nucleus of macaques. *J Neurosci.* 2:1275-1291.
- Marshel JH, Garrett ME, Nauhaus I, Callaway EM. 2011. Functional specialization of seven mouse visual cortical areas. *Neuron.* 72:1040-1054.
- Marshel JH, Kaye AP, Nauhaus I, Callaway EM. 2012. Anterior-Posterior Direction Opponency in the Superficial Mouse Lateral Geniculate Nucleus. *Neuron.* 76:713-720.
- Marshel JH, Mori T, Nielsen KJ, Callaway EM. 2010. Targeting single neuronal networks for gene expression and cell labeling in vivo. *Neuron.* 67:562-574.
- Martin-Cortecero J, Nuñez A. 2016. Sensory responses in the medial prefrontal cortex of anesthetized rats. Implications for sensory processing. *Neuroscience.* 339:109-123.
- Martin PR. 1986. The projection of different retinal ganglion cell classes to the dorsal lateral geniculate nucleus in the hooded rat. *Exp brain Res.* 62:77-88.

- Masland RH. 2001. Neuronal diversity in the retina. *Curr Opin Neurobiol.* 11:431-436.
- Masland RH. 2012. The neuronal organization of the retina. *Neuron.* 76:266-280.
- Mason R, Groos G. 1980. The rats lateral posterior (pulvinar) nucleus: an anatomical and electrophysiological study. *Neurosci Lett, Suppl.* 5:295.
- Mason R, Groos GA. 1981. Cortico-recipient and tecto-recipient visual zones in the rat's lateral posterior (pulvinar) nucleus: an anatomical study. *Neurosci Lett.* 25:107-112.
- Masterson SP, Li J, Bickford ME. 2009. Synaptic organization of the tectorecipient zone of the rat lateral posterior nucleus. *J Comp Neurol.* 515:647-663.
- Matsuda W, Furuta T, Nakamura KC, Hioki H, Fujiyama F, Arai R, Kaneko T. 2009. Single Nigrostriatal Dopaminergic Neurons Form Widely Spread and Highly Dense Axonal Arborizations in the Neostriatum. *J Neurosci.* 29:444-453.
- Mcdonald AJ, Mascagni F. 1996. Cortico-cortical and cortico-amygdaloid projections of the rat occipital cortex: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study. *Neuroscience.* 71:37-54.
- McHaffie J, Stanford T, Stein B, Coizet V, Redgrave P. 2005. Subcortical loops through the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 28:401-407.
- Merabet L, Desautels A, Minville K, Casanova C. 1998. Motion integration in a thalamic visual nucleus. *Nature.* 396:265-268.
- Métin C, Godement P, Imbert M. 1988. The primary visual cortex in the mouse: receptive field properties and functional organization. *Exp brain Res.* 69:594-612.
- Métin C, Godement P, Saillour P, Imbert M. 1983. [Physiological and anatomical study of the retinogeniculate projections in the mouse]. *C R Seances Acad Sci III.* 296:157-162.
- Miceli D, Repérant J, Marchand L, Ward R, Vesselkin N. 1991. Divergence and collateral axon branching in subsystems of visual cortical projections from the cat lateral posterior nucleus. *J Hirnforsch.* 32:165-173.
- Miguel-Hidalgo JJ, Senba E, Matsutani S, Takatsuji K, Tohyama M. 1989. Adenosine deaminase containing fiber pathway from the superior colliculus to the lateral posterior nucleus of the rat. *Brain Res.* 476:189-193.
- Miller MW, Vogt BA. 1984. Direct connections of rat visual cortex with sensory, motor, and association cortices. *J Comp Neurol.* 226:184-202.
- Minciacchi D, Bentivoglio M, Molinari M, Kultas-Ilinsky K, Ilinsky IA, Macchi G. 1986. Multiple cortical targets of one thalamic nucleus: The projections of the ventral medial nucleus in the cat studied with retrograde tracers. *J Comp Neurol.* 252:106-129.
- Minciacchi D, Molinari M, Bentivoglio M, Macchi G. 1985. The organization of the ipsi- and contralateral claustrorocortical system in rat with notes on the bilateral claustrorocortical projections in cat. *Neuroscience.* 16:557-576.
- Monconduit L, Villanueva L. 2005. The lateral ventromedial thalamic nucleus spreads nociceptive signals from the whole body surface to layer I of the frontal cortex. *Eur J Neurosci.* 21:3395-3402.
- Montero VM. 1993. Retinotopy of cortical connections between the striate cortex and extrastriate visual areas in the rat. *Exp brain Res.* 94:1-15.
- Montero VM, Guillery RW. 1968a. Degeneration in the dorsal lateral geniculate nucleus of the

- rat following interruption of the retinal or cortical connections. *J Comp Neurol.* 134:211-242.
- Montero VM, Guillery RW. 1968b. Degeneration in the dorsal lateral geniculate nucleus of the rat following interruption of the retinal or cortical connections. *J Comp Neurol.* 134:211-242.
- Montero VM, Rojas A, Torrealba F. 1973. Retinotopic organization of striate and peristriate visual cortex in the albino rat. *Brain Res.* 53:197-201.
- Mooney RD, Fish SE, Rhoades RW. 1984. Anatomical and functional organization of pathway from superior colliculus to lateral posterior nucleus in hamster. *J Neurophysiol.* 51:407-431.
- Mooney RD, Nikolettseas MM, Hess PR, Allen Z, Lewin AC, Rhoades RW. 1988. The projection from the superficial to the deep layers of the superior colliculus: an intracellular horseradish peroxidase injection study in the hamster. *J Neurosci.* 8:1384-1399.
- Mooney RD, Nikolettseas MM, Ruiz SA, Rhoades RW. 1988. Receptive-field properties and morphological characteristics of the superior collicular neurons that project to the lateral posterior and dorsal lateral geniculate nuclei in the hamster. *J Neurophysiol.* 59:1333-1351.
- Morgan JL, Berger DR, Wetzel AW, Lichtman JW. 2016. The Fuzzy Logic of Network Connectivity in Mouse Visual Thalamus. *Cell.* 165:192-206.
- Morin PL, Studholme KM. 2014. Retinofugal projections in the mouse. *J Comp Neurol.* 522:3733-3753.
- Morris JS, Ohman A, Dolan RJ. 1999. A subcortical pathway to the right amygdala mediating "unseen" fear. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:1680-1685.
- Mrosovsky N, Hattar S. 2003. Impaired masking responses to light in melanopsin-knockout mice. *Chronobiol Int.* 20:989-999.
- Mrsic-Flogel TD, Hofer SB, Creutzfeldt C, Cloëz-Tayarani I, Changeux J-P, Bonhoeffer T, Hübener M. 2005. Altered map of visual space in the superior colliculus of mice lacking early retinal waves. *J Neurosci.* 25:6921-6928.
- Mufson EJ, Mesulam MM. 1984. Thalamic connections of the insula in the rhesus monkey and comments on the paralimbic connectivity of the medial pulvinar nucleus. *J Comp Neurol.* 227:109-120.
- Muir-Robinson G, Hwang BJ, Feller MB. 2002. Retinogeniculate axons undergo eye-specific segregation in the absence of eye-specific layers. *J Neurosci.* 22:5259-5264.
- Murphy PC, Duckett SG, Sillito AM. 2000. Comparison of the laminar distribution of input from areas 17 and 18 of the visual cortex to the lateral geniculate nucleus of the cat. *J Neurosci.* 20:845-853.
- Murphy PC, Sillito a M. 1987. Corticofugal feedback influences the generation of length tuning in the visual pathway. *Nature.* 329:727-729.
- Murphy PC, Sillito AM. 1996. Functional morphology of the feedback pathway from area 17 of the cat visual cortex to the lateral geniculate nucleus. *J Neurosci.* 16:1180-1192.
- Murphy WJ, Eizirik E, Johnson WE, Zhang YP, Ryder OA, O'Brien SJ. 2001. Molecular phylogenetics and the origins of placental mammals. *Nature.* 409:614-618.

- Murray Sherman S. 2001. Tonic and burst firing: Dual modes of thalamocortical relay. *Trends Neurosci.* 24:122-126.
- Nakagawa Y, Shimogori T. 2012. Diversity of thalamic progenitor cells and postmitotic neurons. *Eur J Neurosci.* 35:1554-1562.
- Nakamura H, Hioki H, Furuta T, Kaneko T. 2015. Different cortical projections from three subdivisions of the rat lateral posterior thalamic nucleus: A single-neuron tracing study with viral vectors. *Eur J Neurosci.* 41.
- Nassi JJ, Callaway EM. 2009. Parallel processing strategies of the primate visual system. *Nat Rev Neurosci.* 10:360-372.
- Nauta WJ, Gyax PA. 1954. Silver impregnation of degenerating axons in the central nervous system: a modified technic. *Stain Technol.* 29:91-93.
- Négyessy L, Gál V, Farkas T, Toldi J. 2000. Cross-modal plasticity of the corticothalamic circuits in rats enucleated on the first postnatal day. *Eur J Neurosci.* 12:1654-1668.
- Niell CM. 2011. Exploring the next frontier of mouse vision. *Neuron.* 72:889-892.
- Niell CM, Stryker MiP. 2011. Modulation of visual responses by behavioral state in mouse visual cortex. 65:472-479.
- Niell CM, Stryker MP. 2008. Highly Selective Receptive Fields in Mouse Visual Cortex. *J Neurosci.* 28:7520-7536.
- Nieuwenhuys R, Donkelaar H, Nicholson C. 1998. *The Central Nervous System of Vertebrates.* Springer, EEUU: Ilustrada.
- Nikonov SS, Kholodenko R, Lem J, Pugh EN. 2006. Physiological features of the S- and M-cone photoreceptors of wild-type mice from single-cell recordings. *J Gen Physiol.* 127:359-374.
- Nissl F. 1913. Die Grosshirnanteile des Kaninchens. *Arch f??r Psychiatr und Nervenkrankheiten.* 52:867-953.
- Nomura T, Nishimura Y, Gotoh H, Ono K. 2016. Rapid and efficient gene delivery into the adult mouse brain via focal electroporation. *Sci Rep.* 6:29817.
- Nosedá R, Jakubowski M, Kainz V, Borsook D, Burstein R. 2011. Cortical projections of functionally identified thalamic trigeminovascular neurons: implications for migraine headache and its associated symptoms. *J Neurosci.* 31:14204-14217.
- Nosedá R, Kainz V, Jakubowski M, Gooley JJ, Saper CB, Digre K, Burstein R. 2010a. A neural mechanism for exacerbation of headache by light. *Nat Neurosci.* 13:239-245.
- Nosedá R, Kainz V, Jakubowski M, Gooley JJ, Saper CB, Digre K, Burstein R. 2010b. A neural mechanism for exacerbation of headache by light. *Nat Neurosci.* 13:239-245.
- O'Brien BJ, Abel PL, Olavarria JF. 2001. The retinal input to calbindin-D28k-defined subdivisions in macaque inferior pulvinar. *Neurosci Lett.* 312:145-148.
- Oberlaender M, de Kock CPJ, Bruno RM, Ramirez A, Meyer HS, Dercksen VJ, Helmstaedter M, Sakmann B. 2012. Cell Type-Specific Three-Dimensional Structure of Thalamocortical Circuits in a Column of Rat Vibrissa Cortex. *Cereb Cortex.* 22:2375-2391.
- Oh SW, Harris JA, Ng L, Winslow B, Cain N, Mihalas S, Wang Q, Lau C, Kuan L, Henry AM, Mortrud MT, Ouellette B, Nguyen TN, Sorensen SA, Slaughterbeck CR, Wakeman W, Li Y, Feng D, Ho A, Nicholas E, Hirokawa KE, Bohn P, Joines KM, Peng H, Hawrylycz MJ, Phillips JW, Hohmann

- JG, Wahnoutka P, Gerfen CR, Koch C, Bernard A, Dang C, Jones AR, Zeng H. 2014. A mesoscale connectome of the mouse brain. *Nature*. 508:207-214.
- Ohno S, Kuramoto E, Furuta T, Hioki H, Tanaka YR, Fujiyama F, Sonomura T, Uemura M, Sugiyama K, Kaneko T. 2012. A morphological analysis of thalamocortical axon fibers of rat posterior thalamic nuclei: A single neuron tracing study with viral vectors. *Cereb Cortex*. 22:2840-2857.
- Olavarria J. 1979. A horseradish peroxidase study of the projections from the latero-posterior nucleus to three lateral peristriate areas in the rat. *Brain Res*. 173:137-141.
- Olavarria J, Montero VM. 1984. Relation of callosal and striate-extrastriate cortical connections in the rat: morphological definition of extrastriate visual areas. *Exp brain Res*. 54:240-252.
- Olavarria J, Montero VM. 1989. Organization of visual cortex in the mouse revealed by correlating callosal and striate-extrastriate connections. *Vis Neurosci*. 3:59-69.
- Olavarria J, Serra-Oller MM, Yee KT, van Sluyters RC. 1988. Topography of interhemispheric connections in neocortex of mice with congenital deficiencies of the callosal commissure. *J Comp Neurol*. 270:575-590.
- Olavarria J, Van Sluyters RC. 1984. Callosal connections of the posterior neocortex in normal-eyed, congenitally anophthalmic, and neonatally enucleated mice. *J Comp Neurol*. 230:249-268.
- Olsen GM, Witter MP. 2016. Posterior parietal cortex of the rat: Architectural delineation and thalamic differentiation. *J Comp Neurol*. 524:3774-3809.
- Olsen SR, Bortone DS, Adesnik H, Scanziani M. 2012. Gain control by layer six in cortical circuits of vision. *Nature*. 483:47-52.
- Osten P, Margrie TW. 2013. Mapping brain circuitry with a light microscope. *Nat Methods*. 10:515-523.
- Ottersen OP, Storm-Mathisen J. 1984. Glutamate- and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique. *J Comp Neurol*. 229:374-392.
- Papadopoulos GC, Dori I. 1993. Dil labeling combined with conventional immunocytochemical techniques for correlated light and electron microscopic studies. *J Neurosci Methods*. 46:251-258.
- Papp EA, Leergaard TB, Calabrese E, Johnson GA, Bjaalie JG. 2014. Waxholm Space atlas of the Sprague Dawley rat brain.
- Parent M, Parent A. 2005. Single-axon tracing and three-dimensional reconstruction of centre médian-parafascicular thalamic neurons in primates. *J Comp Neurol*. 481:127-144.
- Paulussen M, Jacobs S, Van Der Gucht E, Hof PR, Arckens L. 2011. Cytoarchitecture of the mouse neocortex revealed by the low-molecular-weight neurofilament protein subunit. *Brain Struct Funct*. 216:183-199.
- Peel AL, Klein RL. 2000. Adeno-associated virus vectors: Activity and applications in the CNS. *J Neurosci Methods*. 98:95-104.
- Pemberton H. 1891. Recent investigations on the structure and relations of the optic thalami. *J Comp Neurol*. 1:135-148.
- Perry VH. 1980. A tectocortical visual pathway in the rat. *Neuroscience*. 5:915-927.

- Perry VH, Cowey A. 1982. A sensitive period for ganglion cell degeneration and the formation of aberrant retino-fugal connections following tectal lesions in rats. *Neuroscience*. 7:583-594.
- Perry VH, Cowey A. 1984. Retinal ganglion cells that project to the superior colliculus and pretectum in the macaque monkey. *Neuroscience*. 12:1125-1137.
- Petrof I, Sherman SM. 2013. Functional significance of synaptic terminal size in glutamatergic sensory pathways in thalamus and cortex. *J Physiol*. 591:3125-3131.
- Pfeiffenberger C, Yamada J, Feldheim DA. 2006. Ephrin-As and patterned retinal activity act together in the development of topographic maps in the primary visual system. *J Neurosci*. 26:12873-12884.
- Pierce JP, Lewin GR. 1994. An ultrastructural size principle. *Neuroscience*. 58:441-446.
- Pinault D. 1996. A novel single-cell staining procedure performed in vivo under electrophysiological control: Morpho-functional features of juxtacellularly labeled thalamic cells and other central neurons with biocytin or Neurobiotin. *J Neurosci Methods*. 65:113-136.
- Pinault D. 2004. The thalamic reticular nucleus: structure, function and concept. *Brain Res Brain Res Rev*. 46:1-31.
- Pinto LH, Enroth-Cugell C. 2000. Tests of the mouse visual system. *Mamm Genome*. 11:531-536.
- Piscopo DM, El-Danaf RN, Huberman AD, Niell CM. 2013. Diverse visual features encoded in mouse lateral geniculate nucleus. *J Neurosci*. 33:4642-4656.
- Porrero C. 2016. Arquitecturas axónicas y organización de las neuronas de proyección multispecífica del tálamo: estudio del núcleo posterior del tálamo.
- Porrero C, Rodríguez-Moreno J, Quetglas JI, Smerdou C, Furuta T, Clascá F. 2016. A Simple and Efficient In Vivo Non-viral RNA Transfection Method for Labeling the Whole Axonal Tree of Individual Adult Long-Range Projection Neurons. *Front Neuroanat*. 10:27.
- Porrero C, Rodríguez-Moreno J, Smerdou C, Furuta T, Clascá F, Quetglas JI. 2016. A Simple and Efficient In Vivo Non-viral RNA Transfection Method for Labeling the Whole Axonal Tree of Individual Adult Long-Range Projection Neurons. *Front Neuroanat*. 10.
- Prensa L, Parent A. 2001. The nigrostriatal pathway in the rat: A single-axon study of the relationship between dorsal and ventral tier nigral neurons and the striosome/matrix striatal compartments. *J Neurosci*. 21:7247-7260.
- Protti DA, Flores-Herr N, Li W, Massey SC, Wässle H. 2005. Light Signaling in Scotopic Conditions in the Rabbit, Mouse and Rat Retina: A Physiological and Anatomical Study. *J Neurophysiol*. 93:3479-3488.
- Provencio I, Cooper HM, Foster RG. 1998. Retinal projections in mice with inherited retinal degeneration: implications for circadian photoentrainment. *J Comp Neurol*. 395:417-439.
- Prusky GT, Douglas RM. 2003. Developmental plasticity of mouse visual acuity. *Eur J Neurosci*. 17:167-173.
- Prusky GT, Douglas RM. 2004. Characterization of mouse cortical spatial vision. *Vision Res*. 44:3411-3418.
- Puelles L, Rubenstein JLR. 2003. Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci*. 26:469-476.

- Purushothaman G, Marion R, Li K, Casagrande VA. 2012. Gating and control of primary visual cortex by pulvinar. *Nat Neurosci.* 15:905-912.
- Rafols JA, Valverde F. 1973. The structure of the dorsal lateral geniculate nucleus in the mouse. A Golgi and electron microscopic study. *J Comp Neurol.* 150:303-332.
- Ramón y Cajal S. 1900. *Textura del Sistema Nervioso del Hombre y de los Vertebrados*. Madrid, Spain.
- Rancz EA, Franks KM, Schwarz MK, Pichler B, Schaefer AT, Margrie TW. 2011. Transfection via whole-cell recording in vivo: bridging single-cell physiology, genetics and connectomics. *Nat Neurosci.* 14:527-532.
- Rausell E. 1991. Histochemical and Immunocytochemical Compartments of the Thalamic VPM Nucleus in Monkeys and Their Relationship to the Representational Map.
- Rausell E, Avendaño C. 1985. Thalamocortical neurons projecting to superficial and to deep layers in parietal, frontal and prefrontal regions in the cat. *Brain Res.* 347:159-165.
- Reep RL, Chandler HC, King V, Corwin J V. 1994. Rat Posterior Parietal Cortex - Topography of Corticocortical and Thalamic Connections. *Exp Brain Res.* 84.
- Reep RL, Corwin J V. 2009. Posterior parietal cortex as part of a neural network for directed attention in rats. *Neurobiol Learn Mem.* 91:104-113.
- Reep RL, Corwin J V. 1999. Topographic organization of the striatal and thalamic connections of rat medial agranular cortex. *Brain Res.* 841:43-52.
- Reep RL, Corwin J V, Cheatwood JL, Van Vleet TM, Heilman KM, Watson RT. 2004. A rodent model for investigating the neurobiology of contralateral neglect. *Cogn Behav Neurol.* 17:191-194.
- Reep RL, Corwin J V, Hashimoto A, Watson RT. 1987. Efferent connections of the rostral portion of medial agranular cortex in rats. *Brain Res Bull.* 19:203-221.
- Reep RL, Corwin J V, King V. 1996. Neuronal connections of orbital cortex in rats: Topography of cortical and thalamic afferents. *Exp Brain Res.* 111:215-232.
- Reese BE. 1988. «Hidden lamination» in the dorsal lateral geniculate nucleus: the functional organization of this thalamic region in the rat. *Brain Res Rev.* 13:119-137.
- Reichova I, Sherman SM. 2004. Somatosensory Corticothalamic Projections: Distinguishing Drivers From Modulators. *J Neurophysiol.* 92:2185-2197.
- Reid RC. 2012. From Functional Architecture to Functional Connectomics. *Neuron.* 75:209-217.
- Reiner A, Veenman CL, Medina L, Jiao Y, Del Mar N, Honig MG. 2000. Pathway tracing using biotinylated dextran amines. *J Neurosci Methods.* 103:23-37.
- Résibois A, Rogers JH. 1992. Calretinin in rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroscience.* 46:101-134.
- Rhim I, Coello-Reyes G, Ko H-K, Nauhaus I. 2017. Maps of cone opsin input to mouse V1 and higher visual areas. *J Neurophysiol.* 117:1674-1682.
- Ribak CE, Peters A. 1975. An autoradiographic study of the projections from the lateral geniculate body of the rat. *Brain Res.* 92:341-368.
- Rivlin-Etzion M, Zhou K, Wei W, Elstrott J, Nguyen PL, Barres BA, Huberman AD, Feller MB. 2011.

- Transgenic Mice Reveal Unexpected Diversity of On-Off Direction-Selective Retinal Ganglion Cell Subtypes and Brain Structures Involved in Motion Processing. *J Neurosci.* 31:8760-8769.
- Robertson RT. 1983. Efferents of the pretectal complex: separate populations of neurons project to lateral thalamus and to inferior olive. *Brain Res.* 258:91-95.
- Robson JA, Hall WC. 1977. The organization of the pulvinar in the grey squirrel (*Sciurus carolinensis*). I. Cytoarchitecture and connections. *J Comp Neurol.* 173:355-388.
- Rodríguez-Moreno J, Rollenhagen A, Arlandis J, Santuy A, Merchan-Pérez A, DeFelipe J, Lübke JHR, Clasca F. 2017. Quantitative 3D Ultrastructure of Thalamocortical Synapses from the «Lemniscal» Ventral Posteromedial Nucleus in Mouse Barrel Cortex. *Cereb Cortex.* 1-17.
- Rompani SB, Müllner FE, Wanner A, Zhang C, Roth CN, Yonehara K, Roska B. 2017. Different Modes of Visual Integration in the Lateral Geniculate Nucleus Revealed by Single-Cell-Initiated Transsynaptic Tracing. *Neuron.* 93:767-776.e6.
- Rosa MGP, Krubitzer LA. 1999. The evolution of visual cortex: Where is V2? *Trends Neurosci.* 22:242-248.
- Rosa MGP, Manger PR. 2005. Clarifying homologies in the mammalian cerebral cortex: The case of the third visual area (V3). *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 32:327-339.
- Rose J. 1942. The ontogenetic development of the rabbit's diencephalon. *Compo Neurol.* 77:61-129.
- Rose JE, Woolsey CN. 1949a. The relations of thalamic connections, cellular structure and evocable electrical activity in the auditory region of the cat. *J Comp Neurol.* 91:441-466.
- Rose JE, Woolsey CN. 1949b. Organization of the mammalian thalamus and its relationships to the cerebral cortex. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1:391-403-4.
- Roska B, Molnar A, Werblin FS. 2006. Parallel Processing in Retinal Ganglion Cells: How Integration of Space-Time Patterns of Excitation and Inhibition Form the Spiking Output. *J Neurophysiol.* 95:3810-3822.
- Roth MM, Dahmen JC, Muir DR, Imhof F, Martini FJ, Hofer SB. 2015. Thalamic nuclei convey diverse contextual information to layer 1 of visual cortex. *Nat Neurosci.* 19:148.
- Roth MM, Dahmen JC, Muir DR, Imhof F, Martini FJ, Hofer SB. 2016. Thalamic nuclei convey diverse contextual information to layer 1 of visual cortex. *Nat Neurosci.* 19:299-307.
- Roth MM, Helmchen F, Kampa BM. 2012. Distinct Functional Properties of Primary and Posteromedial Visual Area of Mouse Neocortex. *J Neurosci.* 32:9716-9726.
- Rovó Z, Ulbert I, Acsády L. 2012. Drivers of the primate thalamus. *J Neurosci.* 32:17894-17908.
- Royce GJ. 1983. Single thalamic neurons which project to both the rostral cortex and caudate nucleus studied with the fluorescent double labeling method. *Exp Neurol.* 79:773-784.
- Rubio-Garrido P, Pérez-de-Manzo F, Clascá F. 2007. Calcium-binding proteins as markers of layer-I projecting vs. deep layer-projecting thalamocortical neurons: A double-labeling analysis in the rat. *Neuroscience.* 149:242-250.
- Rubio-Garrido P, Pérez-De-Manzo F, Porrero C, Galazo MJ, Clascá F. 2009. Thalamic input to distal apical dendrites in neocortical layer 1 is massive and highly convergent. *Cereb Cortex.* 19:2380-2395.

- Saalmann YB. 2014. Intralaminar and medial thalamic influence on cortical synchrony, information transmission and cognition. *Front Syst Neurosci.* 8:1-8.
- Saalmann YB, Kastner S. 2009. Gain control in the visual thalamus during perception and cognition. *Curr Opin Neurobiol.* 19:408-414.
- Saalmann YB, Kastner S. 2011. Cognitive and Perceptual Functions of the Visual Thalamus. *Neuron.* 71:209-223.
- Saalmann YB, Pinsk MA, Wang L, Li X, Kastner S. 2012. The Pulvinar Regulates Information Transmission Between Cortical Areas Based on Attention Demands. *Science* (80-). 337:753-756.
- Sakai ST, Grofova I, Bruce K. 1998. Nigrothalamic projections and nigrothalamocortical pathway to the medial agranular cortex in the rat: Single- and double-labeling light and electron microscopic studies. *J Comp Neurol.* 391:506-525.
- Saleem AB, Ayaz A, Jeffery KJ, Harris KD, Carandini M. 2013. Integration of visual motion and locomotion in mouse visual cortex. *Nat Neurosci.* 16:1864-1869.
- Salinas KJ, Figueroa Velez DX, Zeitoun JH, Kim H, Gandhi SP. 2017. Contralateral bias of high spatial frequency tuning and cardinal direction selectivity in mouse visual cortex. *J Neurosci.* 1484-17.
- Sanderson KJ, Dreher B, Gayer N. 1991. Prosencephalic connections of striate and extrastriate areas of rat visual cortex. *Exp brain Res.* 85:324-334.
- Santorini G. 1775. *Tabulae Anatomicae.* Parma, Italy.
- Save E, Paz-Villagran V, Alexinsky T, Poucet B. 2005. Functional interaction between the associative parietal cortex and hippocampal place cell firing in the rat. *Eur J Neurosci.* 21:522-530.
- Scheyltjens I, Laramée ME, Van den Haute C, Gijsbers R, Debyser Z, Baekelandt V, Vreysen S, Arckens L. 2015. Evaluation of the expression pattern of rAAV2/1, 2/5, 2/7, 2/8, and 2/9 serotypes with different promoters in the mouse visual cortex. *J Comp Neurol.* 523:2019-2042.
- Schmidt TM, Chen S-K, Hattar S. 2011. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: many subtypes, diverse functions. *Trends Neurosci.* 34:572-580.
- Schmucker C, Seeliger M, Humphries P, Biel M, Schaeffel F. 2005. Grating acuity at different luminances in wild-type mice and in mice lacking rod or cone function. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46:398-407.
- Schmued LC, Fallon JH. 1986. Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Res.* 377:147-154.
- Schneider GE. 1969. Two visual systems. *Science.* 163:895-902.
- Schober W. 1981. [Morphological differentiation in connection with the functional specialization of the mammalian visual system (author's transl)]. *Z Mikrosk Anat Forsch.* 95:395-400.
- Scholl B, Tan AYY, Corey J, Priebe NJ. 2013. Emergence of orientation selectivity in the Mammalian visual pathway. *J Neurosci.* 33:10616-10624.
- Scholpp S, Lumsden A. 2010. Building a bridal chamber: development of the thalamus. *Trends Neurosci.* 33:373-380.

- Schuett S, Bonhoeffer T, Hübener M. 2002. Mapping retinotopic structure in mouse visual cortex with optical imaging. *J Neurosci.* 22:6549-6559.
- Seabrook TA, Burbidge TJ, Crair MC, Huberman AD. 2017. Architecture, Function, and Assembly of the Mouse Visual System. *Annu Rev Neurosci.* 40:499-538.
- Seecharan DJ, Kulkarni AL, Lu L, Rosen GD, Williams RW. 2003. Genetic control of interconnected neuronal populations in the mouse primary visual system. *J Neurosci.* 23:11178-11188.
- Sefton AJ, Mackay-Sim A, Baur LA, Cottee LJ. 1981. Cortical projections to visual centres in the rat: an HRP study. *Brain Res.* 215:1-13.
- Selemon, L; Begovic A. 2007. thalamus in normal and schizophrenic subjects. 151:1-10.
- Sergejeva M, Papp EA, Bakker R, Gaudnek MA, Okamura-Oho Y, Boline J, Bjaalie JG, Hess A. 2015. Anatomical landmarks for registration of experimental image data to volumetric rodent brain atlasing templates. *J Neurosci Methods.* 240:161-169.
- Serizawa M, McHaffie JG, Hoshino K, Norita M. 1994. Corticostriatal and corticotectal projections from visual cortical areas 17, 18 and 18a in the pigmented rat. *Arch Histol Cytol.* 57:493-507.
- Sherman S, Guillery R. 2003. Exploring the thalamus and its role in cortical function. MIT Press.
- Sherman SM. 2007. The thalamus is more than just a relay. *Curr Opin Neurobiol.* 17:417-422.
- Sherman SM. 2012. Thalamocortical interactions. *Curr Opin Neurobiol.* 22:575-579.
- Sherman SM. 2016. Thalamus plays a central role in ongoing cortical functioning. *Nat Neurosci.* 16.
- Sherman SM. 2017. Functioning of Circuits Connecting Thalamus and Cortex. En: *Comprehensive Physiology.* Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. p. 713-739.
- Sherman SM, Guillery RW. 1996. Functional organization of thalamocortical relays. *J Neurophysiol.* 76:1367-1395.
- Sherman SM, Guillery RW. 1998. On the actions that one nerve cell can have on another: distinguishing "drivers" from "modulators". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:7121-7126.
- Sherman SM, Guillery RW. 2002. The role of the thalamus in the flow of information to the cortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 357:1695-1708.
- Sherman SM, Guillery RW. 2006. Exploring the Thalamus and Its Role in Cortical Function.
- Sherman SM, Guillery RW. 2011. Distinct functions for direct and transthalamic corticocortical connections. *J Neurophysiol.* 106:1068-1077.
- Sherman SM, Spear PD. 1982. Organization of visual pathways in normal and visually deprived cats. *Physiol Rev.* 62:738-855.
- Sheskin DJ. 2009. Handbook of Parametric and Nonparametric Statistical Procedures. *Ann Stat.* 18:989-1001.
- Shi C, Davis M. 2001. Visual pathways involved in fear conditioning measured with fear-potentiated startle: behavioral and anatomic studies. *J Neurosci.* 21:0-9844.
- Shi W, Xianyu A, Han Z, Tang X, Li Z, Zhong H, Mao T, Huang K, Shi S-H. 2017. Ontogenetic establishment of order-specific nuclear organization in the mammalian thalamus. *Nat*

- Neurosci. 20:516-528.
- Shibata H. 1993. Efferent projections from the anterior thalamic nuclei to the cingulate cortex in the rat. *J Comp Neurol.* 330:533-542.
- Shimamura K, Martinez S, Puelles L, Rubenstein JL. 1997. Patterns of gene expression in the neural plate and neural tube subdivide the embryonic forebrain into transverse and longitudinal domains. *Dev Neurosci.* 19:88-96.
- Shipp S. 2003. The functional logic of cortico-pulvinar connections. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 358:1605-1624.
- Shipp S. 2004. The brain circuitry of attention. *Trends Cogn Sci.* 8:223-230.
- Shu SY, Ju G, Fan LZ. 1988. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neurosci Lett.* 85:169-171.
- Sillito M, Murphy PC. 1988. The modulation of the retinal relay to the cortex in the dorsal lateral geniculate nucleus. *Eye (Lond).* 2 Suppl:S221-32.
- Sillito AM, Cudeiro J, Jones HE. 2006. Always returning: feedback and sensory processing in visual cortex and thalamus. *Trends Neurosci.* 29:307-316.
- Simmons PA, Lemmon V, Pearlman AL. 1982a. Afferent and efferent connections of the striate and extrastriate visual cortex of the normal and reeler mouse. *J Comp Neurol.* 211:295-308.
- Simmons PA, Lemmon V, Pearlman AL. 1982b. Afferent and efferent connections of the striate and extrastriate visual cortex of the normal and reeler mouse. *J Comp Neurol.* 211:295-308.
- Simmons PA, Pearlman AL. 1983a. Receptive-field properties of transcallosal visual cortical neurons in the normal and reeler mouse. *J Neurophysiol.* 50:838-848.
- Simmons PA, Pearlman AL. 1983b. Receptive-field properties of transcallosal visual cortical neurons in the normal and reeler mouse. *J Neurophysiol.* 50:838-848.
- Smith PH, Uhlrich DJ, Manning KA, Banks MI. 2012. Thalamocortical projections to rat auditory cortex from the ventral and dorsal divisions of the medial geniculate nucleus. *J Comp Neurol.* 520:34-51.
- Snow JC, Allen HA, Rafal RD, Humphreys GW. 2009. Impaired attentional selection following lesions to human pulvinar: Evidence for homology between human and monkey. *Proc Natl Acad Sci.* 106:4054-4059.
- Sparks D, Rohrer WH, Zhang Y. 2000. The role of the superior colliculus in saccade initiation: a study of express saccades and the gap effect. *Vision Res.* 40:2763-2777.
- Spreafico R, Hayes NL, Rustioni A. 1981. Thalamic projections to the primary and secondary somatosensory cortices in cat: Single and double retrograde tracer studies. *J Comp Neurol.* 203:67-90.
- Sreenivasan V, Kyriakatos A, Mateo C, Jaeger D, Petersen CCH. 2016. Parallel pathways from whisker and visual sensory cortices to distinct frontal regions of mouse neocortex. *Neurophotronics.* 4:31203.
- Stahl JS. 2004. Using eye movements to assess brain function in mice. *Vision Res.* 44:3401-3410.
- Stellwagen D, Shatz CJ. 2002. An instructive role for retinal waves in the development of

- retinogeniculate connectivity. *Neuron*. 33:357-367.
- Stepniewska I. 2003. The Pulvinar Complex. En: Kaas J,, Collins C, editores. *The Primate Visual System*. Ilustrada ed. CRC Press.
- Steriade M. 2003. The corticothalamic system in sleep. *Front Biosci*. 8:d878-99.
- Steriade M, Datta S, Paré D, Oakson G, Curró Dossi RC. 1990. Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems. *J Neurosci*. 10:2541-2559.
- Steriade M, Jones E, Llinás R. 1990. *Thalamic Oscillations and Signalling*. New York: Willey.
- Stone C, Pinto LH. 1993. Response properties of ganglion cells in the isolated mouse retina. *Vis Neurosci*. 10:31-39.
- Stone J. 1978. The number and distribution of ganglion cells in the cat's retina. *J Comp Neurol*. 180:753-771.
- Sugita S, Otani K, Tokunaga A, Terasawa K. 1983. Laminar origin of the tecto-thalamic projections in the albino rat. *Neurosci Lett*. 43:143-147.
- Sukekawa K. 1988. Reciprocal connections between medial prefrontal cortex and lateral posterior nucleus in rats. *Brain Behav Evol*. 32:246-251.
- Sumitomo I, Hsiao CF, Fukuda Y. 1988. Two types of thalamic reticular cells in relation to the two visual thalamocortical systems in the rat. *Brain Res*. 446:354-362.
- Sun D, Kalloniatis M. 2006. Mapping glutamate responses in immunocytochemically identified neurons of the mouse retina. *J Comp Neurol*. 494:686-703.
- Szél Á, Röhlich P, Gaffé AR, Juliusson B, Aguirre G, Van Veen T. 1992. Unique topographic separation of two spectral classes of cones in the mouse retina. *J Comp Neurol*. 325:327-342.
- Takada M. 1992. The lateroposterior thalamic nucleus and substantia nigra pars lateralis: origin of dual innervation over the visual system and basal ganglia. *Neurosci Lett*. 139:153-156.
- Takahashi T. 1985. The organization of the lateral thalamus of the hooded rat. *J Comp Neurol*. 231:281-309.
- Tamamaki N, Nakamura K, Furuta T, Asamoto K, Kaneko T. 2000. Neurons in Golgi-stain-like images revealed by GFP-adenovirus infection in vivo. *Neurosci Res*. 38:231-236.
- Tamietto M, Cauda F, Corazzini LL, Savazzi S, Marzi CA, Goebel R, Weiskrantz L, de Gelder B. 2010. Collicular vision guides nonconscious behavior. *J Cogn Neurosci*. 22:888-902.
- Tamietto M, Pullens P, de Gelder B, Weiskrantz L, Goebel R. 2012. Subcortical Connections to Human Amygdala and Changes following Destruction of the Visual Cortex. *Curr Biol*. 22:1449-1455.
- Tan Z, Sun W, Chen T-W, Kim D, Ji N. 2015. Neuronal Representation of Ultraviolet Visual Stimuli in Mouse Primary Visual Cortex. *Sci Rep*. 5:12597.
- Taube JS. 1998. Head direction cells and the neurophysiological basis for a sense of direction. *Prog Neurobiol*. 55:225-256.
- Tecott LH. 2003. The Genes and Brains of Mice and Men. *Am J Psychiatry*. 160:646-656.
- Tello F. 1904. Disposición macroscópica y estructura del cuerpo geniculado externo. *Trab Lab*

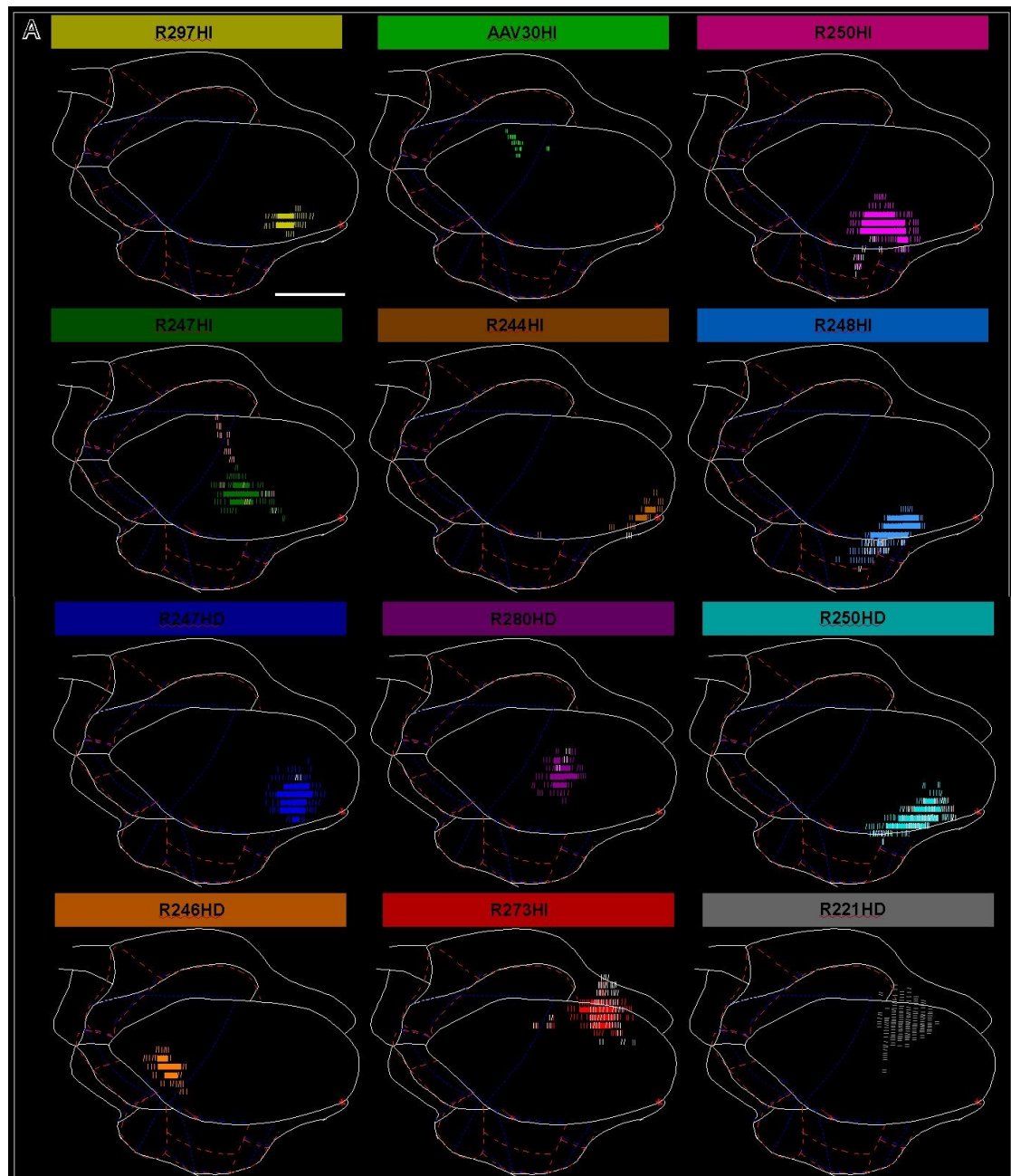
- Invest Biol. 3:39-62.
- Tennant KA, Adkins DL, Donlan NA, Asay AL, Thomas N, Kleim JA, Jones TA. 2011. The organization of the forelimb representation of the C57BL/6 mouse motor cortex as defined by intracortical microstimulation and cytoarchitecture. *Cereb Cortex*. 21:865-876.
- Theyel BB, Llano DA, Sherman SM. 2010. The corticothalamocortical circuit drives higher-order cortex in the mouse. *Nat Neurosci*. 13:84-88.
- Thomas HC, Espinoza SG. 1987. Relationships between interhemispheric cortical connections and visual areas in hooded rats. *Brain Res*. 417:214-224.
- Thompson A, Gribizis A, Chen C, Crair MC. 2017. Activity-dependent development of visual receptive fields. *Curr Opin Neurobiol*. 42:136-143.
- Thompson R. 1979. Dissociation of a visual discrimination task into incentive, location and response habits. *Physiol Behav*. 23:63-68.
- Tiao YC, Blakemore C. 1976. Functional organization in the visual cortex of the golden hamster. *J Comp Neurol*. 168:459-481.
- Tohmi M, Meguro R, Tsukano H, Hishida R, Shibuki K. 2014. The extrageniculate visual pathway generates distinct response properties in the higher visual areas of mice. *Curr Biol*. 24:587-597.
- Tong L, Spear PD. 1986. Single thalamic neurons project to both lateral suprasylvian visual cortex and area 17: A retrograde fluorescent double-labeling study. *J Comp Neurol*. 246:254-264.
- Torrealba F, Olavarria J, Carrasco MA. 1984. Cortical connections of the anteromedial extrastriate visual cortex in the rat. *Exp brain Res*. 56:543-549.
- Ungerleider LG, Galkin TW, Mishkin M. 1983. Visuotopic organization of projections from striate cortex to inferior and lateral pulvinar in rhesus monkey. *J Comp Neurol*. 217:137-157.
- Ungerleider LG, Haxby J V. 1994. «What» and «where» in the human brain. *Curr Opin Neurobiol*. 4:157-165.
- Updyke B V. 1993. Organization of visual corticostriatal projections in the cat, with observations on visual projections to claustrum and amygdala. *J Comp Neurol*. 327:159-193.
- Van Brussel L, Gerits A, Arckens L. 2009. Identification and localization of functional subdivisions in the visual cortex of the adult mouse. *J Comp Neurol*. 514:107-116.
- Van Der Gucht E, Hof PR, Van Brussel L, Burnat K, Arckens L. 2007. Neurofilament protein and neuronal activity markers define regional architectonic parcellation in the mouse visual cortex. *Cereb Cortex*. 17:2805-2819.
- Van Essen DC, Felleman DJ, DeYoe EA, Olavarria J, Knierim J. 1990. Modular and hierarchical organization of extrastriate visual cortex in the macaque monkey. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 55:679-696.
- Van Groen T, Wyss JM. 1992. Projections from the laterodorsal nucleus of the thalamus to the limbic and visual cortices in the rat. *J Comp Neurol*. 324:427-448.
- Van Horn SC, Sherman SM. 2007. Fewer driver synapses in higher order than in first order thalamic relays. *Neuroscience*. 146:463-470.
- Van Le Q, Isbell LA, Matsumoto J, Nguyen M, Hori E, Maior RS, Tomaz C, Tran AH, Ono T, Nishijo H. 2013. Pulvinar neurons reveal neurobiological evidence of past selection for rapid

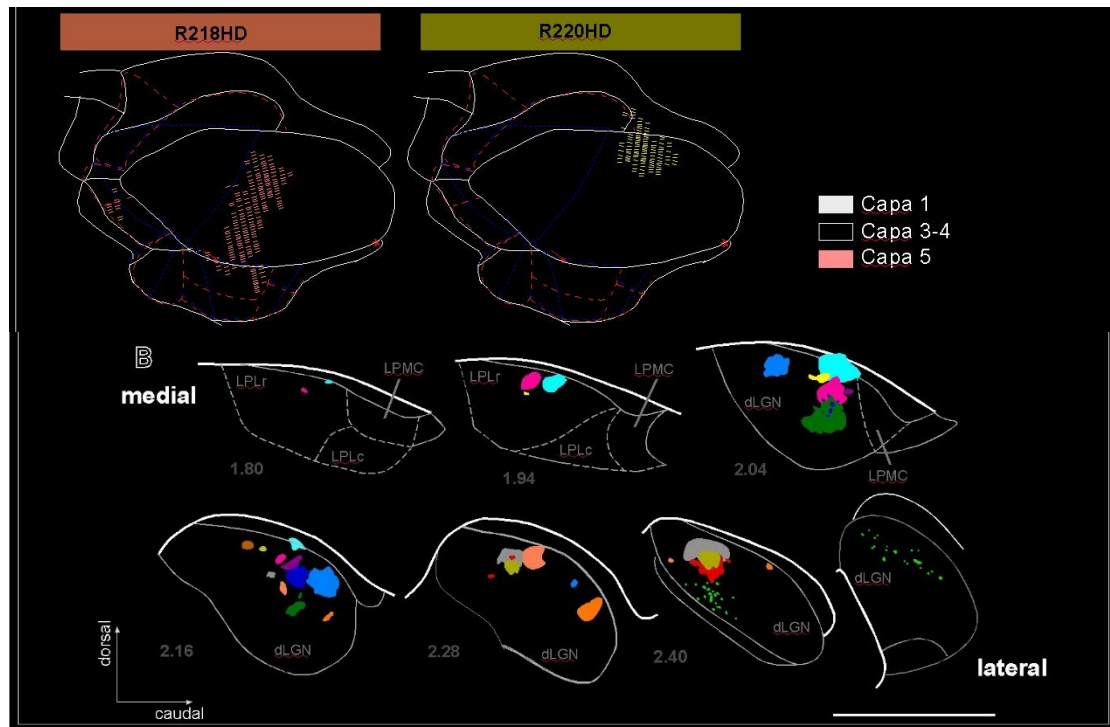
- detection of snakes. *Proc Natl Acad Sci.* 110:19000-19005.
- Van Vleet TM, Heldt SA, Pyter B, Corwin J V, Reep RL. 2003. Effects of light deprivation on recovery from neglect and extinction induced by unilateral lesions of the medial agranular cortex and dorsocentral striatum. *Behav Brain Res.* 138:165-178.
- Vann SD, Aggleton JP, Maguire EA. 2009. What does the retrosplenial cortex do? *Nat Rev Neurosci.* 10:792-802.
- Veinante P, Deschênes M. 2003. Single-cell study of motor cortex projections to the barrel field in rats. *J Comp Neurol.* 464:98-103.
- Velayos JL, Jiménez-Castellanos J, Reinoso-Suárez F. 1989. Topographical organization of the projections from the reticular thalamic nucleus to the intralaminar and medial thalamic nuclei in the cat. *J Comp Neurol.* 279:457-469.
- Vercelli A, Repici M, Garbossa D, Grimaldi A. 2000. Recent techniques for tracing pathways in the central nervous system of developing and adult mammals. *Brain Res Bull.* 51:11-28.
- Vertes RP. 2002. Analysis of projections from the medial prefrontal cortex to the thalamus in the rat, with emphasis on nucleus reuniens. *J Comp Neurol.* 442:163-187.
- Viaene AN, Petrof I, Sherman SM. 2011a. Synaptic Properties of Thalamic Input to the Subgranular Layers of Primary Somatosensory and Auditory Cortices in the Mouse. *J Neurosci.* 31:12738-12747.
- Viaene AN, Petrof I, Sherman SM. 2011b. Synaptic Properties of Thalamic Input to Layers 2/3 and 4 of Primary Somatosensory and Auditory Cortices. *J Neurophysiol.* 105:279-292.
- Viaene AN, Petrof I, Sherman SM. 2011c. Synaptic Properties of Thalamic Input to Layers 2/3 and 4 of Primary Somatosensory and Auditory Cortices. *J Neurophysiol.* 105:279-292.
- Viaene AN, Petrof I, Sherman SM. 2011d. Properties of the thalamic projection from the posterior medial nucleus to primary and secondary somatosensory cortices in the mouse. *Proc Natl Acad Sci.* 108:18156-18161.
- Vue TY, Aaker J, Taniguchi A, Kazemzadeh C, Skidmore JM, Martin DM, Martin JF, Treier M, Nakagawa Y. 2007. Characterization of progenitor domains in the developing mouse thalamus. *J Comp Neurol.* 505:73-91.
- Wagor E, Mangini NJ, Pearlman AL. 1980. Retinotopic organization of striate and extrastriate visual cortex in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Comp Neurol.* 193:187-202.
- Wallace DJ, Greenberg DS, Sawinski J, Rulla S, Notaro G, Kerr JND. 2013. Rats maintain an overhead binocular field at the expense of constant fusion. *Nature.* 498:65-69.
- Wan XCS, Trojanowski JQ, Gonatas JO. 1982. Cholera toxin and wheat germ agglutinin conjugates as neuroanatomical probes: their uptake and clearance, transganglionic and retrograde transport and sensitivity. *Brain Res.* 243:215-224.
- Wang L, Fontanini A, Maffei A. 2011. Visual experience modulates spatio-temporal dynamics of circuit activation. *Front Cell Neurosci.* 5:12.
- Wang Q, Burkhalter A. 2007. Area Map of Mouse Visual Cortex. *J Comp Neurol.* 502:339-357.
- Wang Q, Burkhalter A. 2013. Stream-Related Preferences of Inputs to the Superior Colliculus from Areas of Dorsal and Ventral Streams of Mouse Visual Cortex. *J Neurosci.* 33:1696-1705.

- Wang Q, Gao E, Burkhalter A. 2007a. In vivo transcranial imaging of connections in mouse visual cortex. *J Neurosci Methods*. 159:268-276.
- Wang Q, Gao E, Burkhalter A. 2007b. In vivo transcranial imaging of connections in mouse visual cortex. *J Neurosci Methods*. 159:268-276.
- Wang Q, Gao E, Burkhalter A. 2011a. Gateways of Ventral and Dorsal Streams in Mouse Visual Cortex. *J Neurosci*. 31:1905-1918.
- Wang Q, Gao E, Burkhalter A. 2011b. Gateways of ventral and dorsal streams in mouse visual cortex. *J Neurosci*. 31:1905-1918.
- Wang Q, Henry AM, Harris JA, Oh SW, Joines KM, Nyhus J, Hirokawa KE, Dee N, Mortrud M, Parry S, Ouellette B, Caldejon S, Bernard A, Jones AR, Zeng H, Hohmann JG. 2014. Systematic comparison of adeno-associated virus and biotinylated dextran amine reveals equivalent sensitivity between tracers and novel projection targets in the mouse brain. *J Comp Neurol*. 522:1989-2012.
- Wang Q, Sporns O, Burkhalter A. 2012. Network Analysis of Corticocortical Connections Reveals Ventral and Dorsal Processing Streams in Mouse Visual Cortex. *J Neurosci*. 32:4386-4399.
- Wei P, Liu N, Zhang Z, Liu X, Tang Y, He X, Wu B, Zhou Z, Liu Y, Li J, Zhang Y, Zhou X, Xu L, Chen L, Bi G, Hu X, Xu F, Wang L. 2015. Processing of visually evoked innate fear by a non-canonical thalamic pathway. *Nat Commun*. 6:6756.
- Wernet MF, Huberman AD, Desplan C. 2014. So many pieces, one puzzle: cell type specification and visual circuitry in flies and mice. *Genes Dev*. 28:2565-2584.
- West MJ, Gundersen HJ. 1990. Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J Comp Neurol*. 296:1-22.
- White EL, Weinfeld E, Lev DL. 2004. Quantitative analysis of synaptic distribution along thalamocortical axons in adult mouse barrels. *J Comp Neurol*. 479:56-69.
- Wilke M, Turchi J, Smith K, Mishkin M, Leopold DA. 2010. Pulvinar inactivation disrupts selection of movement plans. *J Neurosci*. 30:8650-8659.
- Wilks T a, Harvey AR, Rodger J. 2013. Seeing with Two Eyes: Integration of Binocular Retinal Projections in the Brain Tenelle. *Funct Brain Mapp Endeavor to Understand Work Brain*. 227-250.
- Willis T. 1964. *Cerebri Anatome: Cui Accessit Nervorum Descriptio et Usus*. London, UK: Manyn & Allestry.
- Winsky L, Montpied P, Arai R, Martin BM, Jacobowitz DM. 1992. Calretinin distribution in the thalamus of the rat: immunohistochemical and in situ hybridization histochemical analyses. *Neuroscience*. 50:181-196.
- Wong-Riley M. 1979. Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry. *Brain Res*. 171:11-28.
- Wouterlood FG, Bloem B, Mansvelder HD, Luchicchi A, Deisseroth K. 2014. A fourth generation of neuroanatomical tracing techniques: Exploiting the offspring of genetic engineering. *J Neurosci Methods*. 235:331-348.
- Wouterlood FG, Saldana E, Witter MP. 1990. Projection from the nucleus reuniens thalami to the hippocampal region: Light and electron microscopic tracing study in the rat with the anterograde tracer Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J Comp Neurol*. 296:179-203.

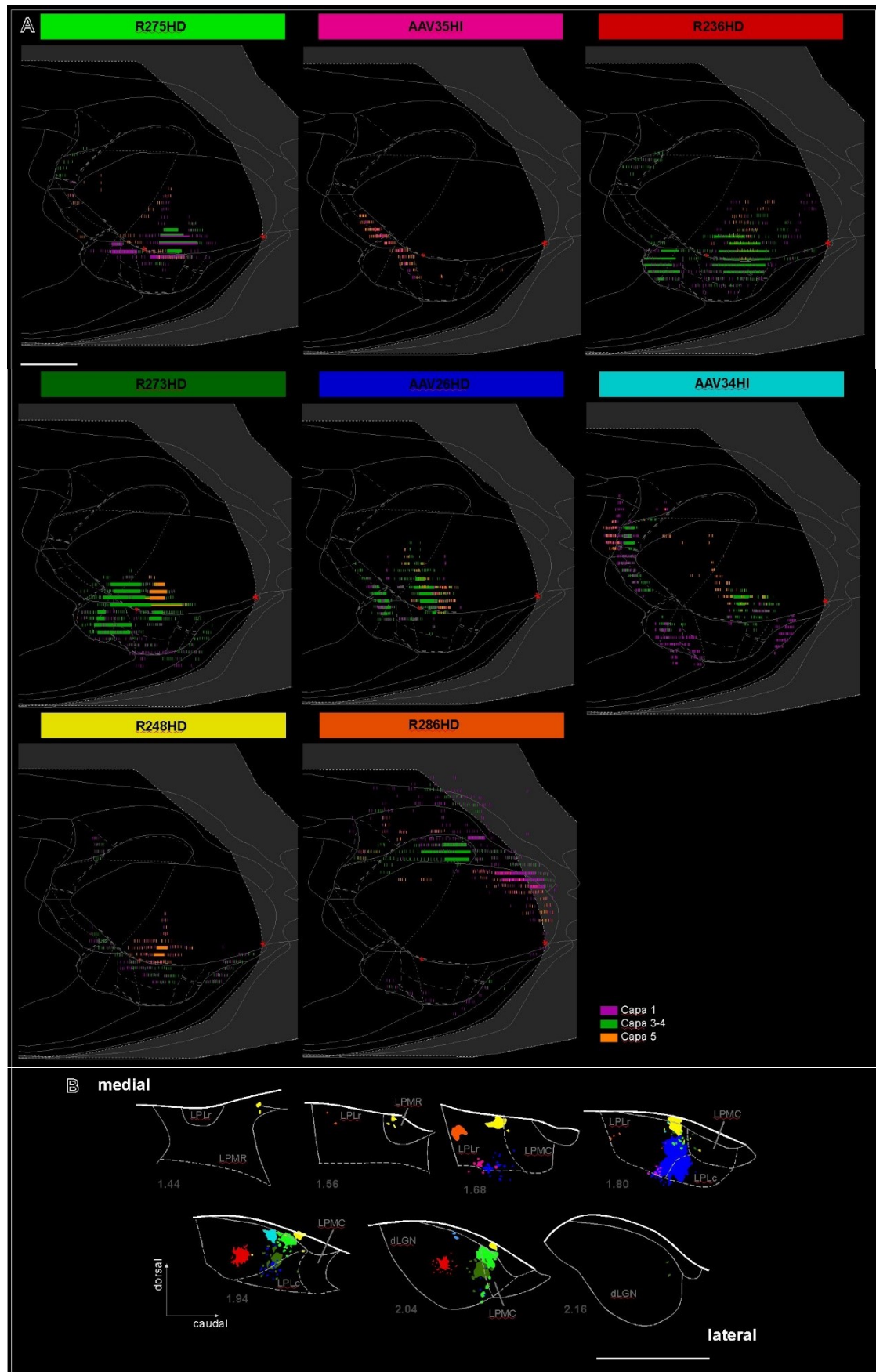
- Wu CC, Russell RM, Nguyen RT, Karten HJ. 2003. Tracing developing pathways in the brain: a comparison of carbocyanine dyes and cholera toxin b subunit. *Neuroscience*. 117:831-845.
- Wurtz RH, McAlonan K, Cavanaugh J, Berman RA. 2011. Thalamic pathways for active vision. *Trends Cogn Sci*. 15:177-184.
- Xu H, Furman M, Mineur YS, Chen H, King SL, Zenisek D, Zhou ZJ, Butts DA, Tian N, Picciotto MR, Crair MC. 2011. An Instructive Role for Patterned Spontaneous Retinal Activity in Mouse Visual Map Development. *Neuron*. 70:1115-1127.
- Xu HP, Burbridge TJ, Chen MG, Ge X, Zhang Y, Zhou ZJ, Crair MC. 2015. Spatial pattern of spontaneous retinal waves instructs retinotopic map refinement more than activity frequency. *Dev Neurobiol*. 75:621-640.
- Yamadori T. 1977. An experimental anatomical study on the optic nerve fibers in the rat by using a new selective silver impregnation technique: termination of the main optic tract. *Okajimas Folia Anat Jpn*. 54:229-245.
- Yamawaki N, Radulovic J, Shepherd GMG. 2016. A Corticocortical Circuit Directly Links Retrosplenial Cortex to M2 in the Mouse. *J Neurosci*. 36:9365-9374.
- Yorke CH, Caviness VS. 1975. Interhemispheric neocortical connections of the corpus callosum in the normal mouse: a study based on anterograde and retrograde methods. *J Comp Neurol*. 164:233-245.
- Yushkevich PA, Piven J, Hazlett HC, Smith RG, Ho S, Gee JC, Gerig G. 2006. User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: significantly improved efficiency and reliability. *Neuroimage*. 31:1116-1128.
- Zhang Y, Kim I-J, Sanes JR, Meister M. 2012. The most numerous ganglion cell type of the mouse retina is a selective feature detector. *Proc Natl Acad Sci*. 109:E2391-E2398.
- Zhao X, Chen H, Liu X, Cang J. 2013. Orientation-selective responses in the mouse lateral geniculate nucleus. *J Neurosci*. 33:12751-12763.
- Zhou NA, Maire PS, Masterson SP, Bickford ME. 2017. The mouse pulvinar nucleus: Organization of the tectorecipient zones. *Vis Neurosci*. 34:E011.
- Zhuang J, Ng L, Williams D, Valley M, Li Y, Garrett M, Waters J. 2017. An extended retinotopic map of mouse cortex. *Elife*. 6:1-29.
- Zingg B, Hintiryan H, Gou L, Song MY, Bay M, Bienkowski MS, Foster NN, Yamashita S, Bowman I, Toga AW, Dong H-W. 2014. Neural Networks of the Mouse Neocortex. *Cell*. 156:1096-1111.

ANEXOS



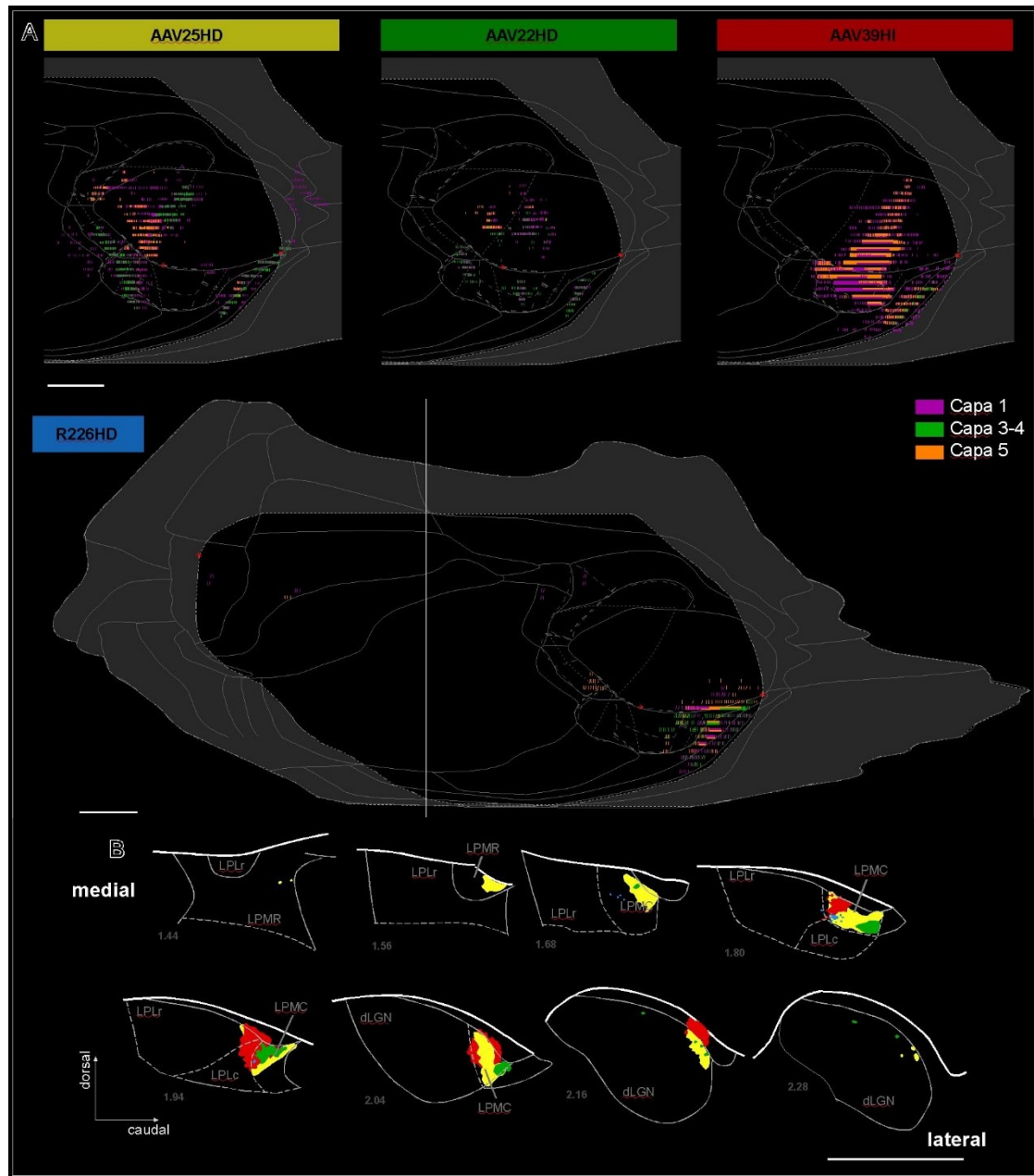


Anexo 1. . Resumen de los casos analizados para el estudio mediante marcado anterógrado de las proyecciones del dLGN. (A) Mapas planos de las cortezas visuales primaria y asociativas donde se representan los axones terminales marcados correspondientes a cada caso de depósito de trazador anterógrado. Cada color utilizado se corresponde con el número del caso indicado en la parte superior. En los casos en los que aparecen marcado en capa 1 o capas profundas aparecen líneas de color blanco o rosa claro respectivamente, como se indica en la leyenda situada en el extremo inferior derecho. (B) Esquemas de los cortes sagitales del tálamo visual donde se representan los depósitos de trazador (BDA y AAV-GFP) correspondientes con los casos anteriores en una progresión medio-lateral. Barras de calibración de 1mm (A, B). Ver lista de abreviaturas.

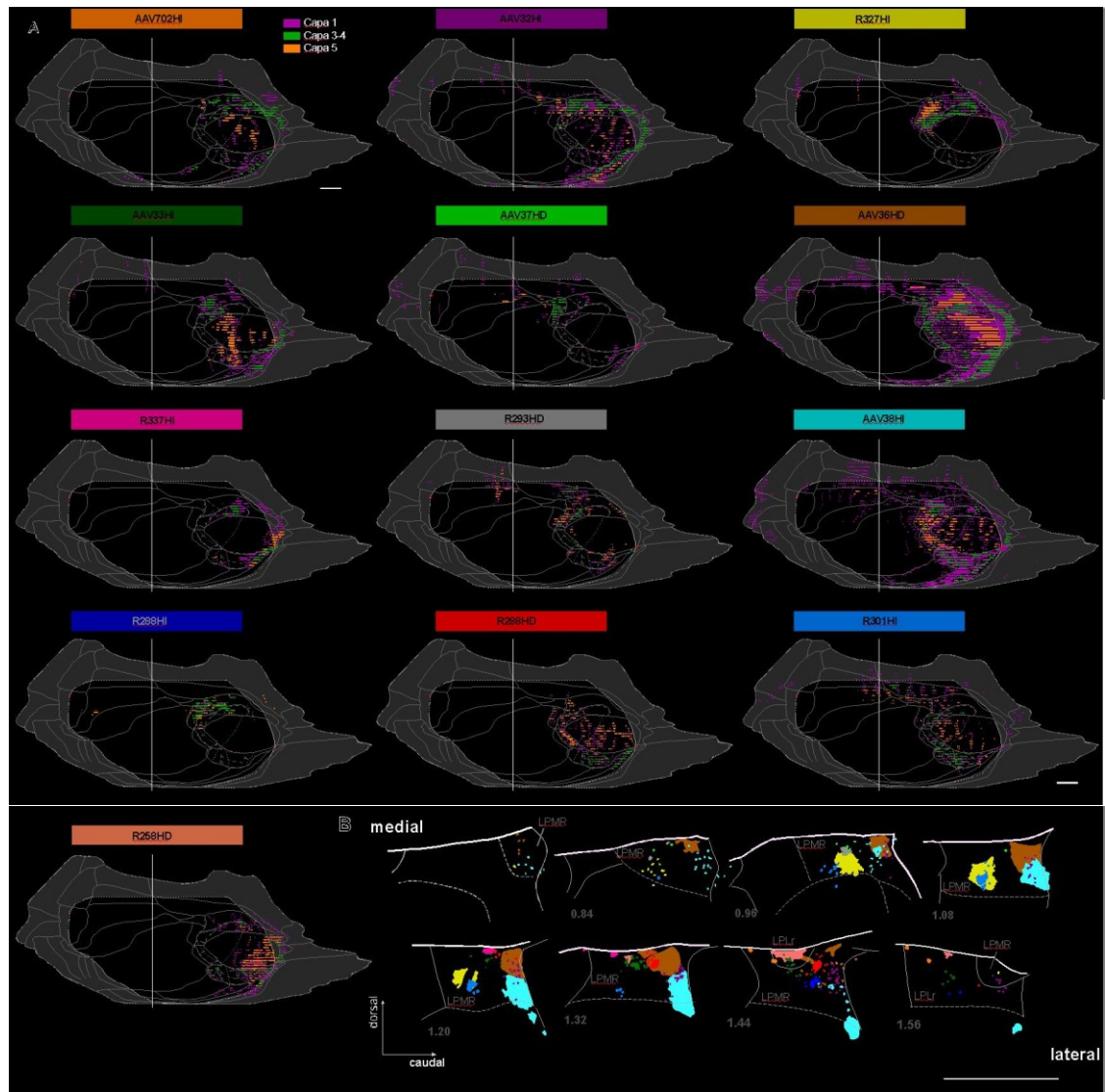


Anexo 2. Resumen de todos los casos considerados para el estudio mediante marcado anterógrado de las proyecciones del núcleo LPL. (A) Mapas planos de la superficie cortical donde se representan mediante líneas verticales los terminales axónicos marcados formando un gradiente de proximidad de estas líneas a medida que

aumenta la densidad de terminales marcados en corteza. Los tres colores utilizados en la representación del marcaje se corresponden con las distintas capas corticales donde aparecen estos axones, como se indica en la leyenda en la parte inferior de la figura. (B) Esquemas de los cortes sagitales del tálamo visual donde se representan los depósitos de trazador (BDA y AAV-GFP) correspondientes con los casos anteriores en una progresión medio-lateral. Barras de calibración de 1mm (A, B). Ver lista de abreviaturas.



Anexo 3. Resumen de los todos casos considerados para el estudio mediante marcado anterógrado de las proyecciones del núcleo LPMC. (A) Mapas planos de la superficie cortical donde se representan mediante líneas verticales los terminales axónicos marcados formando un gradiente de proximidad de estas líneas a medida que aumenta la densidad de terminales marcados en corteza. Los tres colores utilizados en la representación del marcaje se corresponden con las distintas capas corticales donde aparecen estos axones, como se indica en la leyenda en la parte inferior de la figura. (B) Esquemas de los cortes sagitales del tálamo visual donde se representan los depósitos de trazador (BDA y AAV-GFP) correspondientes con los casos anteriores en una progresión medio-lateral. Barras de calibración de 1mm (A, B). Ver lista de abreviaturas.



Anexo 4. Resumen de los casos considerados para el estudio mediante marcado anterógrado de las proyecciones del núcleo LPMR. (A) Mapas planos de la superficie cortical donde se representan mediante líneas verticales los terminales axónicos marcados formando un gradiente de proximidad de estas líneas a medida que aumenta la densidad de terminales marcados en corteza. Los tres colores utilizados en la representación del marcaje se corresponden con las distintas capas corticales donde aparecen estos axones, como se indica en la leyenda en la parte inferior de la figura. (B) Esquemas de los cortes sagitales del tálamo visual donde se representan los depósitos de trazador (BDA y AAV-GFP) correspondientes con los casos anteriores en una progresión medio-lateral. Barras de calibración de 1mm (A, B). Ver lista de abreviaturas.